

ÉVALUATION DE LA PLASTICITÉ DE L'AULNE, DE *FRANKIA* SPP. ET DE LA
SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE FACE AU DRAINAGE MINIER ACIDE

par

Michaël Rodrigue-Morin

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 21 mai 2018

Le 21 mai 2018

le jury a accepté le mémoire de Monsieur Michaël Rodrigue-Morin dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Sébastien Roy
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Codirecteur de recherche
Département de chimie

Professeure Carole Beaulieu
Évaluatrice interne
Département de biologie

Professeure Pascale B. Beaugard
Présidente-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

L'industrie minière est en constante évolution depuis la révolution industrielle. Elle fournit aux citoyens du monde un confort et une qualité de vie améliorée. En effet, les métaux issus de cette industrie se retrouvent partout. Malheureusement, ce confort a un prix, car à plusieurs niveaux l'industrie minière est dommageable pour l'environnement. L'excavation minière entraîne la perturbation directe du site (destruction de la forêt boréale primaire, des environnements humides et des plans d'eau) et la destruction de la structure et la stabilité de la roche mère, causant la libération d'éléments chimiques dans l'environnement. De plus, les gisements métalliques contiennent souvent des minéraux sulfurés comme la pyrite. Ceux-ci, une fois extraits, entreront en contact avec l'oxygène et l'eau et enclencheront un processus chimique qui mènera à la formation d'acide sulfurique, composant principal du drainage minier acide. Le processus en question découle de l'oxydation des minéraux sulfurés. La présence d'acide sulfurique aura pour effet d'augmenter l'acidité des sols. Une réaction en chaîne est alors enclenchée, car la réaction d'oxydation se fera plus rapidement en milieu acide. Résultera alors une hausse de la mobilité de plusieurs métaux et du danger de translocation vers les rivières ou les nappes phréatiques.

Au nord du Québec se trouve un grand nombre de mines, car cette partie du territoire recèle d'une multitude de métaux d'intérêt comme l'or, le nickel, le fer et le cuivre. Ce projet de maîtrise porte sur l'une d'entre elles, le site Doyon de la mine aurifère opéré par IAMGOLD Corp. à Preissac, en Abitibi-Témiscamingue. Ce gisement riche en matériaux sulfurés a donc un fort potentiel acidogène. Les minières sont régies par la loi sur la qualité de l'environnement, et plus précisément sur la loi sur les mines. Celle-ci stipule que les minières doivent gérer adéquatement les rejets et que l'exploitant doit

faire approuver son plan de restauration avant le début des activités minières. Il est donc primordial pour les minières d'avoir à leur disposition les technologies nécessaires à la gestion de leur site, afin d'éviter le plus de désagréments possible.

Le but de ce projet était d'améliorer les connaissances des effets du drainage minier acide sur l'aulne, une plante actinorhizienne et sur *Frankia* spp., une actinobactérie filamenteuse du sol. Les aulnes sont endémiques de la région de Val d'Or (Abitibi-Témiscamingue) et sont reconnus comme robustes. En effet, on les retrouve dans des habitats diversifiés tels que les dépôts glaciaires, les dunes de sable, les milieux humides, les sols volcaniques et bien d'autres environnements hostiles. Cette robustesse est en partie expliquée par la symbiose qu'ils font avec *Frankia*. Tandis que l'aulne fournit des photosynthétats (source de carbone) à la bactérie, celle-ci est capable de lui fournir l'azote nécessaire à sa bonne croissance. Dans un contexte minier, la nutrition en azote en effet un défi d'importance. *Frankia* est retrouvée partout dans le monde, dans le sol à l'état naturel. En milieu contaminé, la microflore du sol est habituellement moins saine et la symbiose actinorhizienne entre l'aulne et *Frankia* pourrait en être affectée.

L'objectif de mon projet était de déterminer les effets d'une exposition ponctuelle de l'aulne au drainage minier acide (comme lors d'un déversement causé par le bris d'une digue ou lors d'une crue printanière) sur la symbiose actinorhizienne. La plasticité de ces deux organismes seuls, face au drainage minier acide, a aussi été évaluée. Nous avons aussi déterminé si les aulnes ayant crû en présence de DMA représentent un risque de translocation de métaux lourds au niveau des feuilles. Une telle translocation pourrait entraîner la dispersion de métaux lourds ailleurs dans l'environnement.

Il a été démontré que l'aulne rugueux formait une plus grande biomasse, un plus grand nombre de nodules ainsi qu'une plus grande masse nodulaire que l'aulne crispé. L'aulne crispé avait quant à lui une plus forte allocation nodulaire et une plus grande efficacité symbiotique. L'analyse des différents métaux contenus dans les différentes parties de la plante n'a pu être effectuée que sur l'aulne crispé dû à un manque de temps lors du projet. Il a été démontré que le molybdène était beaucoup plus présent dans les feuilles de plants non inoculés, que les nodules contenaient plus de molybdène, de bore, de phosphore et de cuivre dans le stade de développement précoce et que certains métaux essentiels pour *Frankia*, comme le nickel, s'y retrouvaient en concentrations dépassant le seuil normal de toxicité des plantes. Les aulnes inoculés avec *Frankia* semblaient bien se développer après une exposition ponctuelle au drainage minier acide même si les plants étaient jeunes et avaient cru dans un sol inorganique. Il a aussi été démontré que le statut symbiotique changeait la concentration et la distribution élémentaire à l'intérieur de la plante et permettait d'acquérir certains métaux comme le cobalt, et l'aluminium en plus fortes concentrations tout en restant en dessous du seuil de toxicité de la plante. L'analyse des métalloïdes et des métaux indiquait que la teneur des feuilles d'aulne crispé était en deçà des normes du critère C (sols industriels) pour l'arsenic, le cuivre, le plomb, le zinc, le chrome, le cadmium, le nickel, l'argent, le baryum, le molybdène, le cobalt, le manganèse et le sélénium. Les essais en microplaques ont montré différentes tolérances au drainage minier acide pour *Frankia* sp. Avcl1, *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia alni* ACN14a (placées en ordre croissant de tolérance).

Mots clés : Drainage Minier Acide (DMA), aulne crispé, aulne rugueux, ICP-MS, revégétalisation, symbiose actinorhizienne, *Frankia* spp., métaux lourds, résidus miniers, établissement symbiotique.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le professeur Sébastien Roy, pour l'opportunité qu'il m'a offerte, pour son encadrement et le soutien qu'il m'a fourni tout au long de ma maîtrise. Je dois également exprimer des remerciements sincères à mon codirecteur de recherche, le professeur Jean-Philippe Bellenger ainsi qu'à mes conseillères de maîtrise les professeurs Pascale B. Beauregard et Carole Beaulieu pour leurs idées ainsi que leurs judicieux conseils.

Aussi, un grand merci à tous les membres de mon laboratoire de recherche pour leur support et leur écoute. Mais aussi pour m'avoir permis de découvrir un univers de recherche incroyablement stimulant. Un autre remerciement est destiné aux membres du laboratoire de Jean-Philippe Bellenger, pour leur patience lors de mes nombreuses questions lorsque j'essayais de me familiariser au milieu de la chimie.

Je ne pourrais passer sous silence l'aide du docteur John William (Bill) Shipley pour avoir éclairé ma lanterne avec mes innombrables questions concernant les statistiques.

Enfin, je voudrais aussi remercier ma mère pour m'avoir encouragé à continuer aux études supérieures, à François-Mathieu pour le support et la compréhension qu'il a eu pendant les périodes difficiles et finalement à Bébécky, sans qui je n'aurais pu trouver le courage de me lever à des heures si matinales, me permettant ainsi d'avancer mes multiples travaux ainsi que la rédaction de ce mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
REMERCIEMENTS.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. Exploitation aurifère nord-qubécoise.....	2
1.1. Mine aurifère Doyon.....	3
1.1.1. Technique d'excavation et d'extraction	3
1.1.2. Gestion des dchets	5
1.2. Potentiel acidogène et formation de drainage minier acide	7
1.3. Les mtaux toxiques et essentiels	12
1.3.1. Propriétés des mtaux lourds	13
1.4. Danger d'un dversement de rsidus miniers.....	15
1.5. Problématique.....	17
1.5.1. Sols contaminés autres que miniers	19
1.5.2. Migration, biodisponibilité et normes.....	21
1.5.3. Absorption	23
1.6. Plantes à l'étude; un premier pas vers une solution	27
1.6.1. Tolérance de l'aulne et de <i>Frankia</i> spp. face aux rsidus miniers	30

1.7. Hypothèses	32
1.8. Objectifs	33
1.8. Description et justification du projet	34

CHAPITRE 2 : DÉVELOPPEMENT ET HOMÉOSTASIE ÉLÉMENTAIRE CHEZ L'AULNE ACTINORHIZÉ 35

1. Référence de l'article et contribution de l'auteur	35
2. Apport et originalité de l'article pour la science	36
3. Résumé de l'article en français	36
4. Manuscrit de l'article.....	37
4.1. Abstract.....	37
4.2. Introduction	38
4.3. Material and methods	40
4.3.1. <i>Frankia</i> culture	40
4.3.2. Plants.....	40
4.3.3 Harvesting plants and data collection	41
4.3.4. ICP-MS analysis of metals alder.....	42
4.3.5. Statistical analysis	43
4.4. Results and discussion	44
4.4.1. Morphological growth differences for green and river alder	44
4.4.2. Overall metal level in green alder (PCA).....	49
4.4.3. Metals in leaves, stems, roots and nodules by age and symbiotic status	57
4.4.3.1. Molybdenum, boron and phosphorus.....	57

4.4.3.2. Aluminum, nickel and cobalt.....	61
4.4.3.3. Iron, manganese and copper	64
4.5 Conclusions	67
4.6. Acknowledgment.....	69
5. References.....	70

CHAPITRE 3 : MESURE DE LA PLASTICITÉ DE L'AULNE, DE *FRANKIA* SPP. ET DE LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE FACE AU DRAINAGE MINIER ACIDE

1. Référence de l'article et contribution de l'auteur	75
2. Apport et originalité de l'article pour la science	76
3. Résumé de l'article en français	77
4. Manuscrit de l'article.....	78
4.1. Abstract.....	78
4.2. Introduction	79
4.3. Material and methods	80
4.3.1. Sampling, conservation and ICP-MS analysis of AMD	80
4.3.2. <i>Frankia</i> culture	81
4.3.3. Tolerance of <i>Frankia</i> towards AMD	81
4.3.4. Plants.....	82
4.3.5. Plants harvesting and data collection	84
4.3.6. ICP-MS analysis of metals in alder	85
4.3.7. Statistical analysis	86
4.4. Results and discussion	86
4.4.1. Irradiated native AMD metal content.....	86

4.4.2. Tolerance of <i>Frankia</i> ACN10a to AMD	88
4.4.3. Growth and nodulation of alders exposed to AMD.....	91
4.4.4. Metal composition of leaves	96
4.4.4. Metal composition of nodules	103
4.5. Conclusion	106
4.6. Acknowledgment.....	108
5. References.....	109

CHAPITRE 4 : TOLÉRANCE AU DMA DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE *FRANKIA* **..... 114**

1. Mise en contexte des travaux	114
2. Introduction	115
3. Matériel et méthodes.....	116
3.1. Échantillonnage, conservation et analyse ICP-MS du DMA	116
3.2. Souches bactériennes	117
3.3. Préparation du test de tolérance au DMA.....	119
4. Résultats et discussion	121

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE 129

BIBLIOGRAPHIE..... 135

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	Pourcentage
®	Marque déposée
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Argent
Al	Aluminium
aq	Aqueux
As	Arsenic
Au	Or
B	Bore
BHD	Boue haute densité
Bi	Bismuth
C	Carbone
Ca	Calcium
CCH1	<i>Calcium-Channel 1</i>
Cd	Cadmium
$C\equiv N\equiv C$	Cyanure
Co	Cobalt
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cr	Chrome
Cs	Césium
Cu	Cuivre
CuFeS ₂	Chalcopyrite
Cys	Cystéine
DMA	Drainage minier acide
Etc	Et cetera
Fe	Fer

FeS ₂	Pyrite (disulfure de fer)
g	Gazeux
g/cm ³	Gramme par centimètre cube
Ge	Germanium
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
H	Hydrogène
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
Hg	Mercure
H ₂ O	Monoxyde de dihydrogène (eau)
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
IRT	<i>Iron Regulated Transporter</i>
ISO	Organisation internationale de normalisation
K	Potassium
LRQ	Loi et règlement du Québec
MDDELCC	Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques
MEND	<i>Mine environment neutral drainage</i>
MERN	Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles
Mg	Magnésium
Mg/g	Milligramme par gramme
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
N	Azote
N ₂	Diazote (ou azote atmosphérique)
Na	Sodium
Nb	Niobium
NEMED	Neutralisation d'eaux de drainage dans l'environnement minier
NH ₃	Ammoniac

NH ₄ ⁺	Ammonium
Ni	Nickel
O	Oxygène
P	Phosphore
Pb	Plomb
p. ex.	Par exemple
pH	Potentiel hydrogène
PIB	Produit intérieur brut
Po	Polonium
RAN1	<i>Responsive to Antagonist 1</i>
RLRQ	Recueil des lois et des règlements du Québec
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
s	Solide
S	Soufre
Sb	Antimoine
Se	Sélénium
Si	Silicium
Sr	Strontium
Te	Tellure
Ti	Titane
Tl	Thallium
U	Uranium
V	Vanadium
Zn	Zinc
ZnS	Sphalérite

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Principaux sulfures métalliques classés en ordre croissant de réactivité ainsi que leur composition chimique.....	10
-------------------	---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Activités habituelles de la phase d'exploitation d'une mine.....	5
Figure 2.	Réaction générale de production du DMA.....	9
Figure 3.	Tableau périodique des éléments.....	14
Figure 4.	Génération du DMA dans un site d'enfouissement.....	19
Figure 5.	Mobilité des différents métaux influencée par le pH dans un sol minéral.....	21
Figure 6.	Coupe transversale d'une racine de dicotylédones différenciée et coupe longitudinale de l'extrémité apicale d'une jeune racine.....	25
Figure 7.	Nombre de nodules pour l'aulne rugueux (<i>A. rugosa</i>) et l'aulne crispé (<i>A. crispa</i>) ayant été mis en contact avec des résidus fins acidogènes	31
Figure 8.	Résultats des tests de tolérance au DMA pour les souches <i>Frankia</i> sp. Avcl1 et <i>Frankia alni</i> ACN14a.....	122
Figure 9.	Résultats des tests de tolérance au DMA pour les souches de <i>Frankia</i> isolées sur le site minier de Doyon.....	125

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au Québec, l'industrie minière tient une place d'importance. En 2014, on estimait à 4,6 milliards de dollars (G\$) le total des dépenses d'exploitation et d'exploration des sociétés minières, générant ainsi des revenus estimés à 770,9 millions de dollars (M\$) pour le gouvernement québécois et à 327,2 M\$ pour le gouvernement canadien. Encore pour 2014, la filière minérale québécoise a contribué à plus de 7,6 milliards de dollars au PIB du Québec. Cette industrie comporte environ 4 100 entreprises au Québec, dont le quart se trouve en Abitibi-Témiscamingue avec plus de 45 000 employés à leur charge. Pour comprendre l'importance de l'industrie minière en Abitibi-Témiscamingue, il est intéressant de noter que 15,1% des emplois de cette région y sont associés (moyenne annuelle pour 2014). Pour 2015, un total de 1,66 M\$ en salaires dans le seul secteur de la production minérale était observé. Le sous-sol québécois regorge d'une multitude d'éléments tels le fer (Fe), le nickel (Ni), le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le niobium (Nb), l'or (Au), le lithium (Li), l'argent (Ag) et le zinc (Zn). Il n'est donc pas surprenant que les promoteurs miniers s'y soient intéressés. Cet engouement a commencé en 1847, lors de la découverte de la première pépite d'or en Beauce. Après cela, le secteur minier a continué à se développer de façon lente jusqu'à la fin de la Première Guerre mondiale (Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles (MERN), 2013). Avec le Plan Nord, lancé en 2011, le gouvernement québécois a voulu étendre le développement minier du Nord de la province et favoriser l'exploitation des ressources naturelles au-delà du 49e parallèle (Gouvernement du Québec, 2015). En 2014, le Québec comptait plus de 25 mines actives dans l'ensemble de la province (Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles (MERN), 2014). Toutefois, il existe plusieurs sites miniers abandonnés où les exploitants sont inconnus,

non solvables ou ont disparu. Ces sites sont devenus la propriété du gouvernement du Québec et c'est maintenant à celui-ci que revient la tâche de restaurer ces sites parfois fortement contaminés (Shield, 2014). Un inventaire des sites miniers abandonnés a été effectué en 2011 par le MERN sur le territoire de la province et celui-ci en dénombrait un total de 679 (488 sites d'exploration, 10 carrières et sablières et 188 sites d'exploitation minière), totalisant un coût de restauration de 1,23 G\$, soit 39% du passif environnemental de la province (Charbonneau, 2014).

1. EXPLOITATION AURIFÈRE NORD-QUÉBÉCOISE

La plupart des gisements métalliques du Québec sont retrouvés au nord de la province et c'est à cet endroit que l'on retrouve la plupart des mines d'or. Le Québec compte actuellement 11 mines d'or en activité et huit d'entre elles se situent en Abitibi-Témiscamingue, aux alentours de Rouyn-Noranda et de Val d'Or (Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles (MERN), 2014). Ce regroupement géographique est causé par une structure géologique majeure appelée Faille de Cadillac ou Zone Tectonique de Cadillac-Larder Lake. Celle-ci s'étend sur une longueur de 320 km entre le Québec et l'Ontario et est très riche en gisements aurifères. C'est notamment grâce aux mines construites aux abords de cette faille qu'ont été fondé les villes de Rouyn-Noranda, Val-d'Or, Malartic et plusieurs autres (Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles (MERN), 2013). L'Abitibi-Témiscamingue est un pilier de l'industrie minière québécoise, car 19,6% des emplois liés aux mines pour l'ensemble du Québec s'y trouvent (Institut de la Statistique du Québec, 2014).

1.1. MINE AURIFÈRE DOYON

La mine aurifère de Doyon est la propriété d'IAMGOLD Corp., une minière internationale possédant plusieurs complexes miniers dans le monde entier, dont celui de Doyon-Westwood. La mine se situe en Abitibi-Témiscamingue à égale distance entre Val-d'Or et Rouyn-Noranda et possède une superficie d'environ 1 925 hectares (IAMGOLD, 2016). La mine de Doyon est une mine à ciel ouvert qui n'est plus en fonction depuis les années 2000, mais elle reçoit toujours des résidus d'une mine souterraine adjacente, la mine Westwood. Elle recevait aussi, jusqu'en 2014, les résidus d'une autre mine souterraine, la mine Mouska (IAMGOLD, 2016). Ces trois mines font partie du complexe minier connu sous le nom de Doyon-Westwood. Un plan de restauration, fait à partir du guide conçu à cet effet (MERN et MDDELCC, 2016), a été mis en place par IAMGOLD et est disponible sur l'interface interactif GESTIM (MERN, 2017). Le plan consiste en grande partie à la revégétalisation des haldes avec le mort-terrain, le remblaiement du fossé contenant les eaux contaminées au drainage minier acide (DMA) et le retrait de tous les équipements mobiles et les véhicules (MERN, 2015).

1.1.1. TECHNIQUE D'EXCAVATION ET D'EXTRACTION

Suite à l'excavation et au concassage de la roche sur la mine Westwood, la pierre concassée est transportée jusqu'à la mine Doyon (distance de 16.6 km). Sur cette seconde mine, les roches excavées sont premièrement triées en fonction de leur teneur en minerais. Les stériles, qui sont la fraction de la pierre qui ne contient pas assez de minerai (d'or) pour pouvoir être exploités, sont empilés en monticules, haldes de

stériles. D'autre part, le minerai (fraction rocheuse contenant une plus grande concentration d'or) est quant à lui concassé et broyé afin d'obtenir une fine poudre concentrée en minerai (figure 1). Cette poudre fine sera mise en contact avec du cyanure afin de séparer le minerai de la poudre de pierre. Cette étape est appelée la cyanuration et exploite la solubilité de l'or dans le cyanure. Finalement, la poussière de roche ne contenant pas d'or va être entassée en bassin que l'on appelle bassin de résidus fins et le minerai extrait sera égoutté et concentré afin d'obtenir le minerai prêt à être traité. Les étapes d'extraction et de fonte sont accomplies à même le site de Doyon.

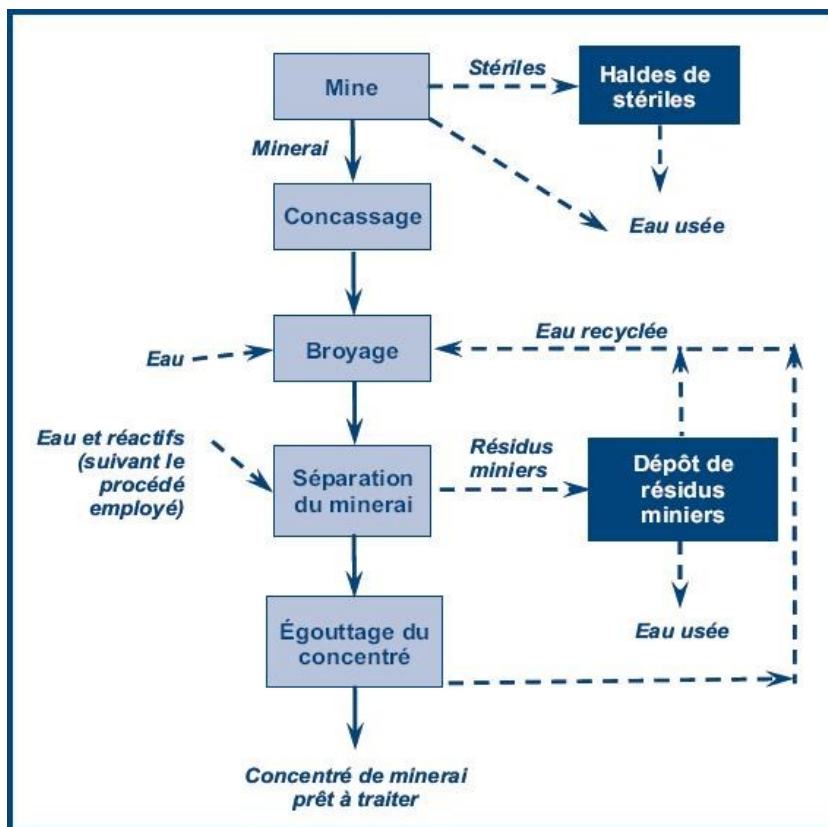


Figure 1. Activités habituelles de la phase d'exploitation d'une mine (Environnement et changement climatique Canada, 2016a).

1.1.2. GESTION DES DÉCHETS

La gestion des déchets sur le site Doyon est majoritairement liée à deux types de résidus : les stériles et les résidus fins. Les résidus de la mine Doyon contiennent de fortes teneurs en soufre, car ils proviennent d'un sol fortement concentré en composés sulfureux. Ils contribuent à la formation d'acide sulfurique (H_2SO_4) (Barrette, 2017;

Guay, 1997). Les principaux composés sulfureux contenus dans la roche mère de la mine Doyon sont la pyrite (FeS_2), la chalcopryrite (CuFeS_2), la sphalérite (ZnS) et le soufre élémentaire immergé (S). Plus en détail, les stériles miniers de Doyon sont composés de schiste à séricite contenant 3 à 7% de pyrite. Ces roches sont reconnues pour être particulièrement friables et pour libérer facilement la pyrite qu'elles contiennent, l'exposant ainsi à l'oxygène et l'eau (Guay, 1997). Cette formation d'acide est aussi observée dans les résidus fins, car ils possèdent aussi des matériaux sulfurés. Ces deux types de déchets nécessitent des types de traitements différents.

Concrètement, les stériles sont des roches de petites ou moyennes tailles qui n'ont pas été éligibles au concassage et au broyage à cause de leurs faibles teneurs en métaux d'intérêt. Ils seront empilés en haldes. Ces haldes peuvent atteindre des hauteurs de plusieurs dizaines de mètres et les pentes aux pourtours de celles-ci peuvent être très prononcées. Le travail sur les haldes devient donc très ardu. Les haldes dans leur ensemble peuvent aisément laisser passer l'air et l'oxygène, ce qui favorise le processus de formation du DMA (processus décrit à la section 1.2). Les eaux de surface, ainsi que les eaux d'exhaure (eaux souterraines et superficielles recueillies sur la mine) acidifiées du site seront récoltées, envoyées vers l'usine de traitement pour boues à haute densité (BHD), traitées et ensuite ré-introduites dans l'environnement (MERN, 2015). Les eaux et extrants minéraux des mines à fort potentiel acidogène, comme Doyon, sont plus complexes en comparaison à celles sans ou avec peu de potentiel acidogène. Pour les résidus fins, la mine les entrepose dans d'énormes bassins (digues) conçus à cet effet. Ayant une faible granulométrie et étant en permanence saturés d'eau pour éviter l'oxydation de la pyrite, la stabilité de ces amas de résidus est très importante. Il est donc nécessaire de construire des digues solides tout autour du dépôt de résidus. Le problème de génération d'acide sulfurique à l'intérieur des bassins est très important, car même si ce sont des résidus fins, ils ne sont pas entièrement compactés. Cela favoriserait la diffusion de l'air et de l'eau (donc

l'oxydation) si ceux-ci n'étaient pas submergés en permanence. Le danger associé aux résidus miniers aurifères provient également de la présence de cyanure (CN^-) engendré par l'étape de cyanuration. Le cyanure est très nocif pour les êtres vivants, car les ions de cyanure inhibent la cytochrome C oxydase, une enzyme mitochondriale nécessaire à la respiration cellulaire (production d'énergie utilisable par la cellule à partir de nutriments, comme le glucose et de dioxygène), un processus cellulaire fondamental (Jensen et al., 1984). La solution à ce problème est étroitement liée à celle utilisée pour l'oxydation et sera effectuée à même les bassins. Elle consiste à étendre ces résidus en couches minces successives sur de grandes étendues afin que le cyanure soit en contact avec la lumière. Cela a pour effet de le dégrader et le rendre inactif (Shifrin et al., 1996).

1.2. POTENTIEL ACIDOGÈNE ET FORMATION DE DRAINAGE MINIER ACIDE

Les résidus miniers sont dits "à potentiel acidogène" lorsqu'ils peuvent engendrer la formation d'acides. La formation de DMA, qui résulte de l'oxydation des matériaux sulfureux, comme ceux contenus dans la pyrite, peut se produire selon quatre mécanismes. Les deux premiers sont appelés oxydation directe et résultent de l'oxydation de la pyrite par l'oxygène seul, avec ou sans présence de microorganismes (oxydation directe biotique et abiotique, respectivement). Les deux autres mécanismes sont appelés oxydation indirecte et résultent de l'oxydation de la pyrite par l'oxygène en présence de fer. Et toujours, avec ou sans présence de microorganismes (oxydation indirecte biotique et abiotique, respectivement) (Charbonneau, 2014). Dans la nature et sur le site de Doyon, l'oxydation de la pyrite est principalement accomplie par oxydation indirecte biotique ou abiotique. Ce processus global peut être décomposé

en trois étapes, décrites par les réactions chimiques suivantes, tel que proposé par (Ferguson et Erickson, 1988). Première étape : oxydation de la pyrite par l'oxygène. En pH supérieur à 4,5, la pyrite est surtout directement et lentement oxydée par l'oxygène en présence d'eau (H₂O). Il y a ainsi formation de fer ferreux (Fe²⁺) et d'acide sulfurique, ce qui occasionne une diminution du pH si aucun composé alcalin n'est présent dans le milieu. Deuxième étape : oxydation du fer ferreux en fer ferrique (Fe³⁺). Le fer ferreux et l'acide sulfurique produits à la première étape vont eux aussi être oxydés, produisant de l'eau et du fer ferrique. Le pH tourne alors autour de 3,5 et 4,5 et le taux d'oxydation est accéléré par l'acidification et l'activité bactérienne, si c'est le cas d'une oxydation biotique. On observe aussi une baisse de l'énergie d'activation du processus d'oxydation, c'est-à-dire que l'oxydation se fera plus facilement et demandera moins d'énergie. Étape 3 : oxydation de la pyrite par le fer ferrique. À pH inférieur à 3,5, le fer ferreux est oxydé en fer ferrique en présence d'eau (réaction principale de cette étape) et il y aura formation de fer ferreux et d'acide sulfurique (le fer ferreux et le fer ferrique sont produits à partir de la pyrite comme à l'étape 1). La réaction, à partir de ce moment, permet au fer ferrique d'oxyder directement la pyrite. Cette réaction cyclique s'accroîtra avec le temps, car les composés produits aux étapes deux et trois seront réutilisés dans d'autres étapes et ainsi de suite. Dans leurs versions intégrales (figure 2), les équations sont : pour la première étape, $4 \text{ FeS}_2 (\text{s}) + 14 \text{ O}_2 (\text{g}) + 4 \text{ H}_2\text{O} (\text{l}) \rightarrow 4 \text{ FeSO}_4 (\text{aq}) + 4 \text{ H}_2\text{SO}_4 (\text{aq}) + \text{énergie}$. Pour la deuxième, $4 \text{ FeSO}_4 (\text{aq}) + \text{O}_2 (\text{g}) + 2 \text{ H}_2\text{SO}_4 (\text{aq}) \rightarrow 2 \text{ Fe}_2(\text{SO}_4)_3 (\text{aq}) + 2 \text{ H}_2\text{O} (\text{l}) + \text{énergie}$. Pour la troisième, $\text{FeS}_2 (\text{s}) + 7 \text{ Fe}_2(\text{SO}_4)_3 (\text{aq}) + 8 \text{ H}_2\text{O} (\text{l}) \rightarrow 15 \text{ FeSO}_4 (\text{aq}) + 8 \text{ H}_2\text{SO}_4 (\text{aq})$ (Ferguson et Erickson, 1988; Lapointe et Fytas, 2005).

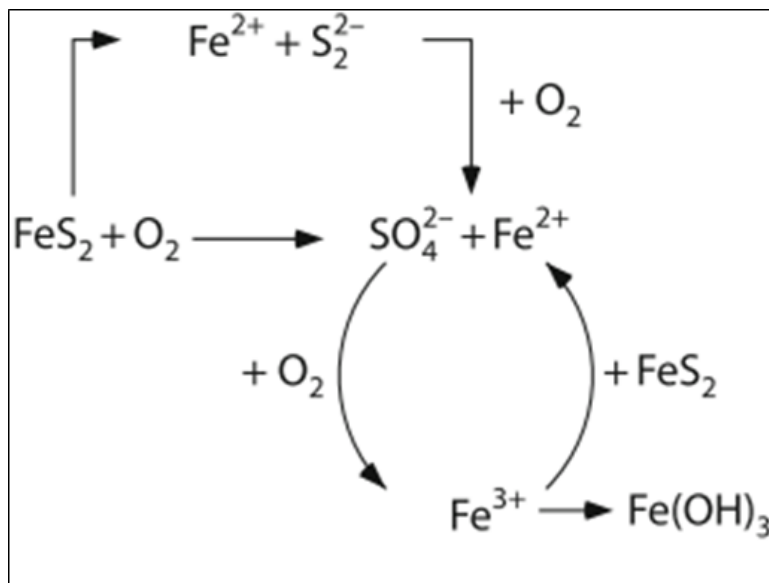


Figure 2. Réaction générale de production du DMA. Modifié de Lapointe et Fytas, 2005; Singer et Stumm, (1970).

Le drainage minier acide est reconnu comme étant l'impact environnemental principal auquel doit faire face l'industrie minière canadienne, car les minéraux sulfurés sont particulièrement abondants dans les gisements métalliques (Lapointe et Fytas, 2005). On les retrouve plus particulièrement dans ceux de Cu, plomb (Pb), Zn, Ni, de Fe et d'Au, métaux qui sont très exploités au Québec et au Canada (Lapointe et Fytas, 2005). Étudié depuis 1970 (MEND, 2001), le problème du DMA semble officiellement reconnu en 1989 lors de la mise sur pied du NEDEM, le programme de neutralisation des eaux de drainage dans l'environnement minier (*Mine Environment Neutral Drainage (MEND)*). Cet organisme a pour mission de mettre au point des technologies visant à contrôler et prévenir la formation de DMA (MEND, 2001). Le tableau 1 présente les sulfures métalliques (et leur composition chimique) susceptibles de se retrouver

dans les résidus miniers, classés selon leur ordre croissant de réactivité (Blowes et al., 1994; Lapointe et Fytas, 2005). La pyrite et la pyrrhotite (Fe_{1-x}S) sont les minéraux les plus fréquemment rencontrés au Canada (Blowes et al., 1994).

Tableau 1. Principaux sulfures métalliques classés en ordre croissant de réactivité ainsi que leur composition chimique. Tiré de Lapointe et Fytas (2005).

Minéraux	Composition
Chalcopryrite	CuFeS_2
Arsénopyrite	FeAsS
Pyrite	FeS_2
Marcasite	FeS_2
Millerite	NiS
Sphalérite	ZnS
Chalcocite	Cu_2S
Galène	PbS
Pyrrhotite	Fe_{1-x}S

La formation de DMA peut être influencée par la présence de certains microorganismes. D'ailleurs, Guay et son équipe ont répertorié en 1997 la présence de certains microorganismes sur le site de Doyon. Par exemple, des bactéries du type *Thiobacillus ferrooxidans* (espèces ferro-oxydantes acidophiles) sont distribuées au sein de la halde, dans les fossés, dans les eaux souterraines et partout où des sulfures sont exposés. Ces dernières se retrouvent accompagnées par *T. thiooxidans*, et *T.*

thioparus là où la teneur en oxygène est adéquate. Ces microorganismes vont directement ou indirectement contribuer au processus de production de DMA. Dans un horizon tempéré, où le gel n'a pas d'emprise, des souches de *Leptospirillum ferrooxidans* ont aussi été identifiées. Celles-ci sont aussi responsables de la production de DMA sur la mine Doyon. Lorsque le pH se situe entre 2,0 et 3,5, que l'aération est soutenue à l'intérieur du milieu poreux et que la température s'apparente à leur température optimale de croissance à l'intérieur de leur niche, l'activité oxydatrice (liée à la production de DMA) de ces bactéries est non négligeable (Guay, 1997). Finalement, la formation de DMA par oxydation des minéraux sulfurés contenus dans les sols ayant un fort potentiel acidogène, en présence d'eau et d'oxygène est une problématique importante. Cette réaction continuera de s'amplifier avec le temps si aucune mesure n'est prise. En date de 2016, on comptait 23 sites miniers à fort potentiel acidogène sur les 230 sites miniers abandonnés au Québec et de ceux-ci, 12 se situent en Abitibi-Témiscamingue (sur les 107 sites abandonnés s'y trouvant). Mis à part la mine de Doyon, la mine Manitou et la mine d'*East Malartic* sont deux autres exemples de mines abandonnées à fort potentiel acidogène (Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles (MERN), 2016).

Le DMA a un pH avoisinant 2,5 à son stade final. Cette valeur peut varier sensiblement d'un site à l'autre, car le pH est sensible aux caractéristiques physico-chimiques et biologiques des différents sols et des différentes régions (Guay, 1997). Une acidité élevée du sol est souvent synonyme d'absence de vie (Black, 2008), cependant le fleuve Rio Tinto en Espagne possède un pH de 2,2, causé par des bactéries liées au DMA et contient plusieurs espèces bactériennes extrêmophiles (bactéries aérobies et acidophiles) (Hudson-Edwards et al., 1999). Tel que mentionné plus haut, le site de Doyon possède aussi une flore microbienne qui lui est propre.

Cette baisse du pH entraîne de grands changements au niveau des résidus, mais plus particulièrement au niveau de la disponibilité des métaux à l'intérieur de ceux-ci. En effet, de faibles baisses du pH peuvent entraîner une forte augmentation de leur biodisponibilité (Kabata-Pendias, 2011; Remon, 2006). Cette biodisponibilité est relative pour chaque métal comme on peut le constater à la figure 5. La production d'acide sulfurique viendra donc solubiliser le fer des résidus, mais aussi d'autres métaux toxiques comme le plomb, l'arsenic (As) et le mercure (Hg). Cela augmentera le risque de contamination des nappes phréatiques, des cours d'eau et des lacs (Petit, 2006).

1.3. LES MÉTAUX TOXIQUES ET ESSENTIELS

Un métal est une matière, issue le plus souvent d'un minerai ou d'un autre métal, doté d'un éclat particulier (brillance), d'une bonne conductibilité thermique et électrique et ayant de bonnes caractéristiques de malléabilité, de dureté et de ductilité. Les métaux ont une structure cristalline à température ambiante, sauf dans le cas du mercure (Kabata-Pendias, 2011). Dans le tableau périodique des éléments, les métaux se trouvent à gauche d'une ligne d'éléments métalliques constituée du bore (B), du silicium (Si), du germanium (Ge), de l'antimoine (Sb) et du polonium (Po) (figure 3). On distingue aussi les métalloïdes, classe d'éléments chimiques plus ou moins bien déterminée qui comprend entre autres le B, le Si, le Ge, l'As, le Sb et le Po. Les membres de cette classe ont des propriétés semblables aux métaux et aux non-métaux. Contrairement aux métalloïdes, les métaux peuvent se combiner aisément avec d'autres éléments pour former des alliages solides utilisables dans l'industrie (Gérard, 2001). De plus, ils ont un lien étroit avec le vivant, car ils ont la capacité d'engendrer chez ceux-ci plusieurs effets directs, sauf dans le cas de l'or, où le seuil

de toxicité est habituellement très élevé (Kabata-Pendias, 2011). Les métaux ont des effets sur tous les règnes du vivant, autant sur les plantes, les microorganismes que les animaux. Certains métaux, appelés métaux essentiels, peuvent avoir des effets bénéfiques en faible quantité. On compte parmi ceux-ci le calcium (Ca), le Co, le Cu, le Fe, le magnésium (Mg), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le Ni, le sélénium (Se), le vanadium (V) et le Zn. Ils interviennent dans les réactions métaboliques ou dans des réactions biochimiques, telles que l'oxydoréduction et l'hydrolyse. D'autres n'ont aucune fonction physiologique ou biologique connue à ce jour et on les considère comme toxiques. Dans cette deuxième catégorie, on compte l'Ag, l'As, l'Au, le bismuth (Bi), le cadmium (Cd), le Hg, le Pb, le Sb et le tellure (Te). Une exception à ce classement existe dans le cas du chrome (Cr). Il est possible de retrouver le Cr dans les métaux essentiels et/ou dans les métaux toxiques (Ma et al., 2015; Pereira et al., 2006; Ramírez-Díaz et al., 2008; Trajanovska et al., 1997) tout dépendant de l'espèce en question. Les sels, en forte concentration, peuvent aussi représenter des composés toxiques, mais ceux-ci ne seront pas abordés dans cet ouvrage.

1.3.1. PROPRIÉTÉS DES MÉTAUX LOURDS

On qualifie de métaux lourds tout métal ayant une masse volumétrique supérieure à 5 g/cm³. Aussi appelés éléments traces, métaux de transition, micronutriments et métaux toxiques, les métaux lourds se situent à partir de la quatrième période (ligne) du tableau périodique des éléments, comme illustré dans la figure 3. Ces métaux sont en quasi-totalité toxiques envers les organismes vivants, et ce même en faibles concentrations. (Dube et Galvez Cloutier, 2005). Certains métaux n'ayant pas les caractéristiques des métaux lourds en font tout de même partie à cause de leur grande toxicité, c'est le cas de l'As et du Se.

Bloc s												Bloc p					
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Bloc d										Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Ti	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Bloc f														
Lanthanides			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
Transuraniens			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Cf	Bk	Es	Fm	Md	No	Lr	

Figure 3. Tableau périodique des éléments. Les métaux se trouvent en bas et à gauche de la ligne rouge. Les métaux lourds sont ceux qui sont ombragés.

Comme mentionné précédemment, les métaux lourds sont très néfastes pour les organismes vivants à certaine à une concentration. Leur phytotoxicité n'est plus à démontrer (Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). La toxicité des métaux lourds est positivement corrélée à leurs concentrations dans le milieu en question. Toutefois, de nombreuses recherches sont en accord sur un point, la toxicité ne résulte pas uniquement des concentrations totales en métaux dans le sol, mais aussi de la fraction biodisponible (Adriano, 2001; McLaughlin et al., 2000). La fraction biodisponible est intimement liée à la mobilité des espèces métalliques, soit l'aptitude de certains métaux à pouvoir être transférés vers d'autres zones du sol (McLaughlin et al., 2000). Les métaux lourds ont aussi des effets notables sur les plantes et les bactéries. En effet, ils entraînent, en forte concentration, une inhibition de la croissance. Chez les plantes, l'inhibition de croissance s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement comme la chlorose foliaire, d'importantes lésions nécrotiques, le jaunissement progressif du feuillage, le repliement ou le dessèchement des feuilles.

Ces conséquences morphologiques résulteraient d'un stress oxydatif dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « *Reactive Oxygen Species* » (ROS), même si les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues (Cheng, 2003; Dietz et al., 1999; Prasad et Hagemeyer, 1999). Toutefois, comme mentionné précédemment, il convient de distinguer lesdits métaux lourds. Certains, comme le Cu, le Fe et le Zn, sont indispensables aux processus physiologiques des plantes (métaux lourds essentiels) et d'autres, comme le Cd, le Cr, le Hg, le Ni ou le Pb n'ont aucune fonction physiologique connue (métaux lourds non essentiels) et sont considérés comme des poisons cellulaires très faiblement tolérables par les plantes (Kabata-Pendias, 2011; Prasad et Hagemeyer, 1999). Chez le microorganisme, la toxicité est due à l'entrée des métaux à l'intérieur de la cellule (arrêt des fonctions physiologiques) ou aux perturbations sur la membrane. La concentration intracellulaire en métaux peut être maintenue de façon adéquate chez les procaryotes grâce à plusieurs mécanismes agissant de concert. Soit des pompes permettant l'entrée de métaux en concentrations faibles, des pompes à efflux pour éliminer le surplus de métaux dans le cytoplasme et des protéines relais amenant les métaux des pompes vers leurs cibles cellulaires. Toutefois, ces mécanismes peuvent être inhibés par la présence de concentrations excessives en métaux (Summers, 2009).

1.4. DANGER D'UN DÉVERSEMENT DE RÉSIDUS MINIERS

Les risques associés au DMA sont bien réels et les enjeux sociaux, économiques, politiques et environnementaux ne sont plus à démontrer. Le déversement de boues provenant de la mine de pyrite d'Aznalcollar au sud de l'Espagne en 1998 en est un bon exemple. Lors de cette catastrophe, plus de 4,5 millions de mètres cubes de boues contaminées à fort potentiel acidogène ont été déversés dans une rivière adjacente et

ont été répandus sur des terres agricoles. Le DMA présent contenait au moins douze métaux à des concentrations plus que toxiques pour l'environnement (Carrasco et al., 2005). En 2000, un incident a eu lieu à Bahia Mare, en Roumanie, où cette fois un déversement similaire entraîna le déversement de 100 000 m³ de DMA contenant entre 50 et 100 tonnes de cyanure, ce qui a contaminé le Danube sur plus de 2 000 km (BBC news, 2000a, 2000b). Plus récemment, en 2014 au Canada, la catastrophe de Mount Polley en Colombie-Britannique mena vers un déversement gargantuesque causé par l'effondrement d'une digue et déversa plus de 10 millions de mètres cubes d'eau ainsi que 4,5 millions de mètres cubes de boues hautement polluées au Pb dans le lac Polley (Environnement et changement climatique Canada, 2016b). Ces catastrophes désastreuses ont coûté plusieurs millions de dollars et ont laissé des traces quasi irréversibles pour l'environnement, sans compter les conséquences qu'elles ont eues sur la santé et la vie des citoyens. Même si la solution idéale est d'éviter ces catastrophes, il faut tout de même penser à essayer de limiter les dégâts si celles-ci surviennent. Une des problématiques souvent abordées dans l'industrie minière est celle de la dispersion des métaux dans l'environnement. En effet, les plantes ayant crû dans des sols contenant de fortes concentrations en métaux sont plus à risque d'absorber et de transloquer les métaux toxiques dans leurs feuilles, ce qui pourrait avoir comme effet de disperser ceux-ci dans l'environnement lors de la perte des feuilles à l'automne (Barrette, 2017). Ce problème inquiétant, même si mal connu, doit être abordé pour mieux comprendre les mécanismes qui régissent la translocation des métaux dans les feuilles, mais aussi afin de connaître les espèces végétales qui sont moins à risque de disperser ces contaminants dans l'environnement.

1.5. PROBLÉMATIQUE

Le problème de génération acide, même s'il n'est pas présent sur toutes les mines, est très préoccupant, car il existe peu de moyens pour stopper ce processus. En effet, une fois enclenché il est très difficile d'y mettre un terme. Parmi les techniques de remédiation utilisées dans l'industrie minière, on retrouve des méthodes *ex situ* (traitement à l'extérieur du site) et des méthodes *in situ* (traitement à même le site). Le premier type de méthode, même s'il s'avère être le plus efficace pour décontaminer les sols, est très dommageable pour l'environnement, car il nécessite plusieurs étapes supplémentaires afin d'excaver et de transporter les sols ou les résidus miniers vers une usine de traitement. C'est à cette usine qu'aura lieu la décontamination avant que les résidus soient ramenés vers le site (Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, 2009). Ces opérations auront un impact environnemental énorme, car ils produiront beaucoup de gaz carbonique (CO₂) (Garbisu et Alkorta, 2001) dû au transport et nécessitent en plus la destruction le site. Cette méthode de remédiation traditionnelle des sols est aussi très coûteuse et ne peut pas être utilisée pour de grandes quantités de sols. À l'usine, un exemple de traitement pouvant être effectué est la lixiviation. Celle-ci consiste en la solubilisation des contaminants à l'aide d'acide ou de chélateurs forts. La lixiviation a comme inconvénient d'extraire presque totalement les nutriments présents dans le sol, rendant difficile l'établissement d'espèces végétales après ce traitement (Colombano et al., 2010). La réhabilitation des sites miniers *in situ* ne vise pas nécessairement la décontamination (remédiation), mais bien la réhabilitation ou la stabilisation du site. Elle implique couramment des solutions écologiques et durables et dans la plupart des cas, on vise le rétablissement d'un couvert végétal. Dans ce cas, elles sont dites *in situ* biologiques et comprennent la bioremédiation (utilisation du métabolisme des microorganismes), la phytoremédiation (utilisation des plantes), comprenant la phytoextraction (élimination des contaminants du sol), la phytostabilisation (séquestration des contaminants dans le sol) et la phytovolatilisation (volatilisation des

contaminants par les plantes) (Mendez et Maier, 2008). Il existe aussi des méthodes *in situ* chimiques. On parle ici, par exemple, de chaulage afin d'augmenter le pH du sol contaminé et induire la stabilisation des contaminants comme les métaux lourds (Mendez and Maier, 2008). Les coûts associés aux méthodes *in situ* sont habituellement moindres que celles *ex situ*, car elles ont l'avantage d'éliminer la partie liée au transport des résidus vers un autre site et ces techniques sont plus facilement applicables à de grandes superficies de sols contaminés. Toutefois, même si ces techniques pourraient être très profitables, elles pourraient difficilement être utilisées afin de régler le problème de production du DMA. Parmi les solutions envisagées pour contrer l'oxydation chimique et biologique des sulfures métalliques des rejets et stériles miniers, il en est une qui vise à les recouvrir d'une couche de matériaux imperméables, argiles et/ou membranes étanches, pour empêcher l'eau et l'oxygène d'atteindre les sulfures (figure 4). En réalité, c'est la solution qui est principalement et presque uniquement adoptée comme solution afin de régler le problème du DMA (Guay, 1997), mais celle-ci possède un inconvénient majeur, elle n'est que temporaire. En effet, il faut surveiller en permanence à ce qu'aucun arbre ne s'y établisse et ne perce la membrane de recouvrement avec ses racines.

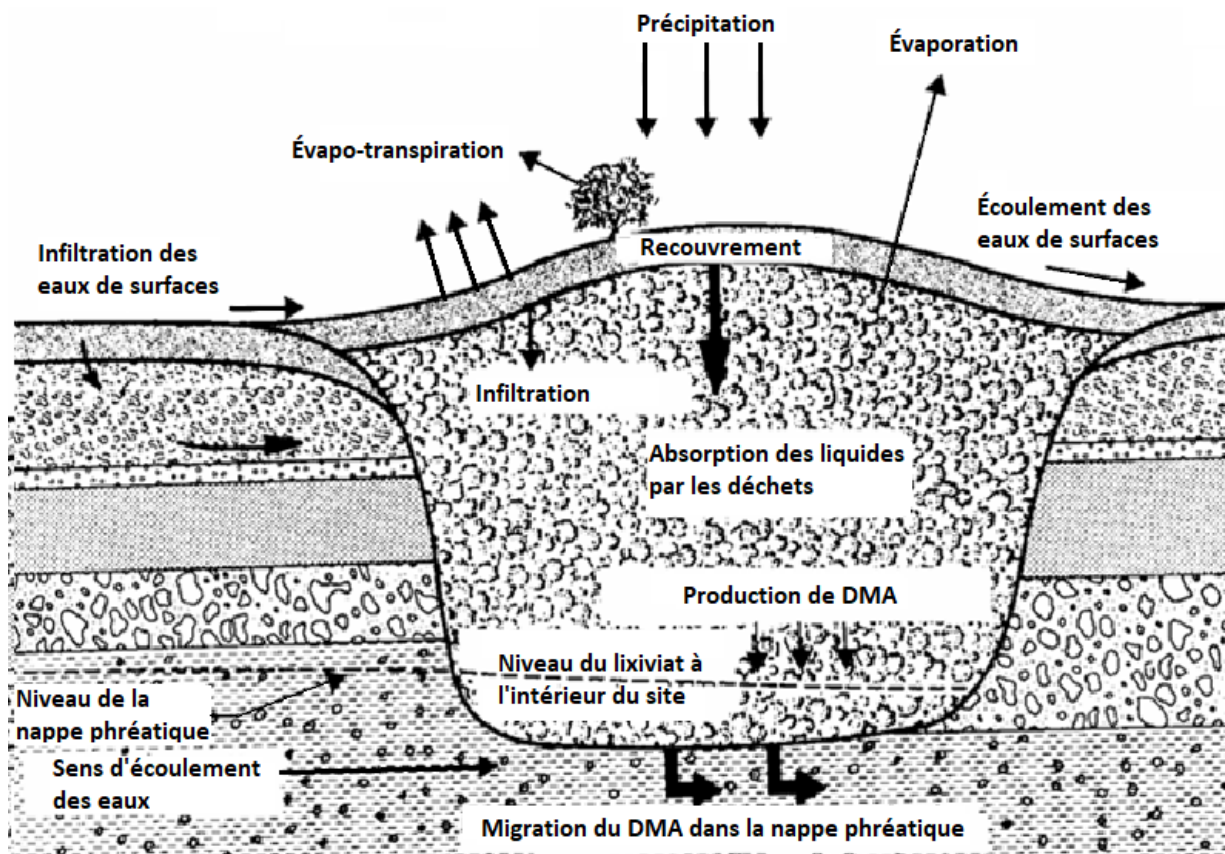


Figure 4. Génération du DMA dans un site d'enfouissement, figure modifiée de Ministère du Développement Durable, (2005).

1.5.1. SOLS CONTAMINÉS AUTRES QUE MINIERES

Les sources principales de contamination des sols en métaux proviennent de l'utilisation de combustibles fossiles, des fonderies, des industries minières, du rejet des eaux usées ou des boues d'épuration et de l'application de pesticides (Garbisu et

Alkorta, 2001; Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, 2009; Pereira et al., 2006). Les sols peuvent aussi s'enrichir en métaux après dispersion et déposition de fines particules de sols par voie aérienne (Greer et al., 2005; Mendez et Maier, 2008). L'environnement regorge de métaux. Ils sont retrouvés dans les sols, les sédiments, les eaux de surfaces et même dans l'air (surtout dans le cas du mercure), sous forme gazeuse ou adsorbés à de fines particules en suspension (Prasad et Hagemeyer, 1999). Certains environnements ont vu leur quantité de métaux atteindre des concentrations faramineuses à cause de contaminations causées par les activités humaines. La majorité des sols contaminés contiennent un mélange complexe de plusieurs métaux (Glick, 2003). Parmi les métaux et métalloïdes plus communément retrouvés dans les sols contaminés au Canada et aux États-Unis, on retrouve : l'As, le Cd, le Cu, le Cr, le Pb, le Hg, le Ni, le Se, l'Ag et le Zn. L'Al, le césium (Cs), le strontium (Sr), l'uranium (U), le Co, le Mn, et le Mo sont aussi retrouvés sur des sites contaminés, mais de façon moins fréquente (McIntyre, 2003). Les métaux contenus dans les différents environnements peuvent être absorbés par les organismes vivants, comme les bactéries et les plantes et ce de plusieurs façons. Dans le cas des plantes, elles pourront absorber les métaux au niveau des racines, de la tige ou des feuilles (Marschner, 1995; Prasad et Hagemeyer, 1999). Les sols contiennent de façon naturelle des métaux toxiques qui ne sont pas disponibles en temps normal, mais le deviennent lorsque la pierre est excavée. C'est par exemple le cas de l'As, qui se retrouve normalement à proximité des veines d'or.

1.5.2. MIGRATION, BIODISPONIBILITÉ ET NORMES

Comme mentionné précédemment, la migration et la biodisponibilité des métaux dépendent en grande partie du pH. À la figure 5, on observe plusieurs exemples de mobilité des métaux dans un sol minéral, selon le pH.

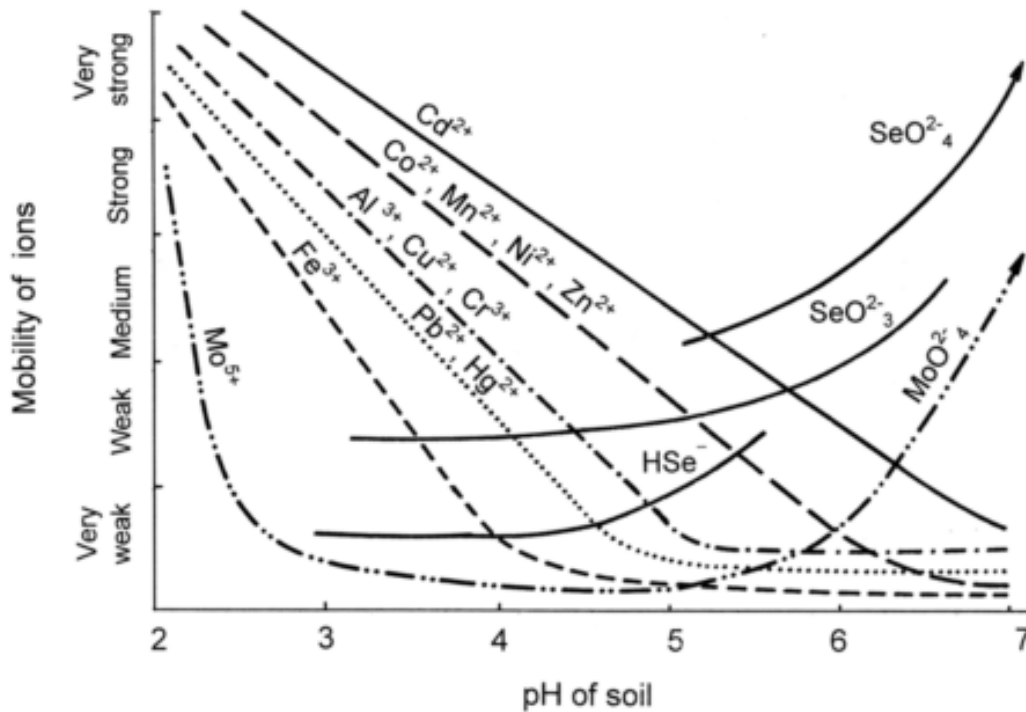


Figure 5. Mobilité des différents métaux influencés par le pH dans un sol minéral.
Tiré de Kabata-Pendias, (2011).

Toutefois, plusieurs autres facteurs peuvent influencer la mobilité. Lors de contamination aux métaux dans les sols, ceux-ci formeront des interactions complexes avec la matrice (sol). Ces interactions sont contrôlées par de nombreux processus incluant les mécanismes d'oxydoréduction et de complexation avec les fractions organiques et inorganiques, les réactions de précipitation et de dissolution, ainsi que des réactions d'adsorption et de désorption. Suite à cela, les différents métaux se retrouveront, dépendamment des interrelations entre les processus et le milieu environnant, sous différentes formes. Ces formes sont : 1) ions libres ou complexes solubles dans la phase aqueuse, occupant des sites d'échange sur des constituants inorganiques du sol, 2) métaux spécifiquement adsorbés (par des liens ioniques ou covalents) sur la fraction inorganique, 3) métaux associés (complexation, adsorption) à la matière organique insoluble ou colloïdale, 4) métaux précipités sous forme d'un métal pur ou non et finalement, dans la structure primaire ou secondaire des minéraux du sol (Deschênes, 2006). Les facteurs ayant le plus d'influence sur la mobilité des métaux sont, selon, la texture, le pH, la teneur en matière organique et l'humidité du sol (Deschênes, 2006; Tran et Ziadi, 2006). L'acidité du sol rend les métaux plus disponibles, sauf dans le cas du molybdène, où c'est le contraire. L'humidité du sol joue un rôle important sur le potentiel d'oxydoréduction (aération et humidité du sol). La texture du sol est liée à sa granulométrie et à sa porosité. Plusieurs études montrent que la toxicité des métaux ne résulte pas uniquement de leur concentration, mais aussi de leur disponibilité (Adriano, 2001; McLaughlin et al., 2000; Remon, 2006; Scheifler et al., 2003). L'industrie minière et ses législateurs ont pris conscience vers la fin du 20^e siècle des impacts environnementaux significatifs que leurs exploitations avaient sur leur milieu (Charbonneau, 2014). L'industrie a dû consentir des efforts soutenus et constants afin de s'adapter et répondre aux exigences toujours plus grandes des gouvernements. Le but ultime étant de minimiser les impacts sur les communautés locales, la faune et la flore (Charbonneau, 2014). En 1995, la bonne volonté du gouvernement provincial à enrayer ces problématiques environnementales se concrétise avec l'obligation de déposer un plan de restauration avant même le début des opérations de la mine. Plus récemment, le gouvernement Marois a augmenté le

montant de la garantie financière de 70% à 100% du montant évalué pour la restauration du site (Charbonneau, 2014). Comme les technologies et leurs coûts sont en continuelle évolution, la mise à jour et l'évaluation du plan de restauration doivent être faites à chaque cinq ans, minimalement (L.R.Q. c. M-13.1, 2017) ou lors de changements dans les activités de la mine (Charbonneau, 2014). Il existe aussi, dans le guide d'intervention pour la protection des sols et la réhabilitation des terrains contaminés, une grille des critères génériques pour les sols qui fixent des valeurs limites réglementaires pour les différents types de sols. À l'intérieur de celle-ci se trouve la norme C (ou critère C) qui s'applique aux sols à vocations industrielles (Beaulieu, 2016). L'effluent final sortant de la mine est quant à lui légiféré par la directive 019 sur l'industrie minière (MDDEP, 2012).

1.5.3. ABSORPTION

Il existe plusieurs voies d'absorption des métaux par les plantes. Bien que l'assimilation des métaux par le biais des feuilles soit possible, celle qui survient le plus est celle au niveau des racines, le sol étant la principale source de métaux pour les plantes. L'absorption des différents métaux au niveau du sol est influencée par une multitude de facteurs comme le pH, la composition en argile et en matière organique, le régime hydrique, la présence d'éléments traces et la capacité d'échange cationique (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Cette absorption au niveau racinaire se fera principalement par diffusion simple (dans le sens du gradient de concentration) au travers de l'apoplasme du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). La figure 6AB présente les différentes parties racinaires. Grâce aux pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines (voir figure 6AB), le transport d'éléments métalliques pourra se faire de façon passive au travers de la paroi cellulaire. Arrivés

aux pectines (qui agissent comme des échangeurs d'ions), et plus précisément au squelette d'acides polygalacturoniques à charges négatives, certains cations seront adsorbés (Briat et Lebrun, 1999). Au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif (contre sens du gradient de concentration) dans la zone de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique) (voir figure 6AB). Comme les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique, le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires devient un processus important (Lasat, 2002). Le rôle du plasmalemm dans la régulation du transport des éléments métalliques est primordial. Le contrôle des ions toxiques peut être effectué grâce à la membrane plasmique, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les métaux non essentiels (Meharg, 1993). Les protéines associées au plasmalemm joueraient néanmoins un rôle essentiel dans le transport des métaux au travers de la membrane plasmique. Une fraction des métaux apoplastiques peut donc rejoindre la voie symplastique et enfin le xylème par les plasmodesmes. Même si les connaissances sur l'absorption des différents métaux ne cessent de s'affiner, elles restent encore limitées, en particulier pour le cuivre (Chaignon, 2001; Greger, 1999), et ces mécanismes d'absorption seront différents pour chacune des espèces métalliques. On sait toutefois que le plomb et le nickel sont absorbés de façon passive via certaines porines et que le cuivre est absorbé de façon active, ce qui nécessite de l'énergie (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Par ailleurs, même si le transport actif est supposément spécifique, certains cations toxiques comme le Cs, le Cd, le Pb et le Cr sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis les cations essentiels. Par exemple, le Cd pourrait emprunter les canaux calciques membranaires, compétitionnant ainsi avec le Ca (Greger, 1999; Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). 70% du Cd entrerait dans la racine par cette voie (Greger, 1999). Des études chez *Arabidopsis thaliana* (plante modèle utilisée pour l'étude génétique) ont démontré qu'un gène codant pour le transport du Fe, *irt1* (*iron-regulated transporter 1*) était exprimé dans les racines à la suite d'une carence en fer (Eide et al., 1996). Les données physiologiques, ainsi que les caractéristiques de ce transporteur, montrent que ce

système de transport n'est pas spécifique, car le transporteur pourrait aussi transporter des ions divalents comme le Zn et le Cd (Briat et Lebrun, 1999). Cette compétition entre les différents ions pourrait donc contribuer à une déficience en Fe et ultimement provoquer une chlorose chez la plante.

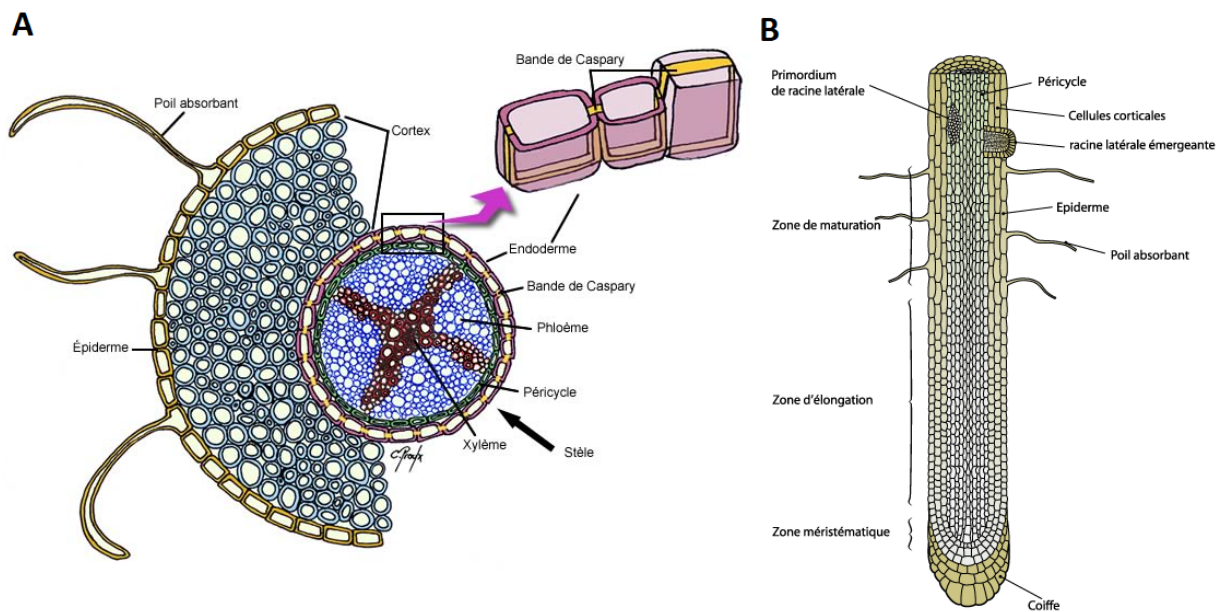


Figure 6. Coupe transversale d'une racine de dicotylédones différenciée (A) (Proulx, 2009) et coupe longitudinale de l'extrémité apicale d'une jeune racine (B). Tiré de Laurette, 2011.

Le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, après leur absorption, est appelé « translocation ». Elle peut nécessiter ou non la prise en charge des éléments par des agents complexants, tels que les acides organiques, les

acides aminés et divers peptides : le citrate peut lier le Fe, un complexe anionique peut lier et transporter le Zn (Alloway, 1995), un acide polyamino-polycarboxylique peut chélater la majorité du Cu et une partie du Ni, mais ce dernier n'a toutefois pas encore été identifié chez les plantes ligneuses (Foy et al., 1978). Le Cd, quant à lui, serait transporté sous forme libre (Alloway, 1995; Greger, 1999). Il est aussi connu qu'à l'intérieur du phloème il y a peu de transport d'éléments toxiques comme les métaux car les cellules s'y trouvant sont vivantes forment un piège supplémentaire (Greger, 1999). Malgré ce mécanisme, une étude a montré que chez certaines plantes, le Fe et le Zn pourraient être transportés via le phloème. En effet, la nicotinamide, un dérivé de la méthionine, pourrait être responsable du transport de ces métaux par cette voie (Briat et Lebrun, 1999). La translocation des métaux au travers de la plante est essentielle afin de pouvoir garder des concentrations adéquates de métaux dans la plante. Par exemple, une plante pourrait transporter certains métaux toxiques vers les feuilles afin d'éliminer ceux-ci à la tombée des feuilles. La distribution vers les organelles des cellules foliaires se fait via l'apoplasme et le symplasme (Karley et al., 2000). Ce processus impliquerait des métallochaperones, comme *CCH1* (*Calcium-Channel 1*) ou des *ATPases* (Himelblau et al., 1998). Par exemple, le cuivre nécessaire aux récepteurs d'éthylène nécessiterait des pompes *RAN1* (*Responsive to Antagonist 1*) (Hirayama et al., 1999). Enfin, les métaux toxiques et les métaux essentiels en excès peuvent être séquestrés dans les vacuoles des cellules foliaires (Kramer et al., 2000) ou bien expulsés hors des cellules via un efflux gouverné par des transporteurs membranaires de type *ATPase* (Briat et Lebrun, 1999).

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques, constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés : les métallothionéines, les phytochélatines, les acides organiques et les acides aminés.

Notons que les phytochélatines ont un lien direct avec la contamination aux métaux. Elles sont des chélateurs intracellulaires de nature peptidique riches en cystéines qui sont uniquement rencontrés dans le règne végétal. Leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds (Cd, Cu, Zn, etc.) et est effectuée par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly) (Dazy, 2008). Toutefois, une nouvelle classe de protéines végétales, nommée métalohistidine, liant plusieurs ions métalliques (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+}) a été identifiée chez l'aulne noir (Gupta et al., 2002).

1.6. PLANTES À L'ÉTUDE; UN PREMIER PAS VERS UNE SOLUTION

L'organisme végétal qui sera utilisé dans mon étude est l'aulne. Celui-ci fait partie des plantes actinorhiziennes, qui ont l'avantage de pouvoir établir une symbiose avec *Frankia*, une actinobactérie fixatrice d'azote. Les plantes actinorhiziennes (angiospermes donc plantes à fleurs) incluent plus de 220 espèces d'arbres et d'arbustes représentant 24 genres répartis dans 8 familles (Bétulacées, Casuarinacées, Coriariacées, Datisacées, Élaégnacées, Myricacées, Rhamnacées et Rosacées (Barrette, 2017; Normand et al., 1996; Peret et al., 2007). Les aulnes font partie de la famille des Bétulacées, genre *Alnus*. On en compte 34 espèces réparties partout dans le monde, sauf en Antarctique (Nittayajarn et Baker, 1989) et ils peuvent atteindre 20 à 30 mètres (Nittayajarn et Baker, 1989). On les retrouve dans presque tous les écosystèmes, mais plus particulièrement au niveau des zones froides ou tempérées de l'hémisphère nord (Normand et al., 1996; Schwintzer et Tjepkema, 1990). Ces plantes pionnières sont aptes à engendrer une succession primaire et on les trouve même dans certains dépôts glaciaires, dunes de sable, sols volcaniques,

zones de glissement de terrain, milieux humides et régions ayant subi des coupes à blanc (Benson et Dawson, 2007; Lefranc et al., 2010; Roy et al., 2007). Les aulnes jouent un rôle important au niveau écologique, car ils ont le pouvoir d'enrichir le sol les entourant en azote grâce à la perte des feuilles à l'automne. Ce phénomène s'explique par la faible translocation de l'azote vers les parties supérieures de la plante (tiges et feuilles) (Dawson, 2008). 70% de l'azote chez l'aulne provient de la fixation de l'azote atmosphérique, possible par les mécanismes de la symbiose actinorhizienne et à l'échelle planétaire, près de 25% de l'azote gazeux (N_2) fixé provient de l'action de plantes actinorhiziennes et de leur symbionte (Dawson, 2008). On note aussi que 45% de l'azote fixé par *Frankia* symbiotique retourne à l'écosystème par le mécanisme de perte de feuilles (Huss-Danell, 1997). Somme toute, l'aulne est une plante pionnière qui peut se développer sur des sites où peu d'autres plantes le peuvent. Toutefois, comme les aulnes nécessitent beaucoup de luminosité afin d'obtenir l'énergie nécessaire au mécanisme de fixation de l'azote, ils sont sensibles au manque d'ensoleillement. Ils ne pourront donc pas survivre après établissement des grands arbres (Dawson, 2008).

La symbiose actinorhizienne précédemment abordée est possible grâce à une bactérie à Gram positif (Normand et al., 1996, 2014) retrouvée majoritairement dans le sol et est observée chez plus de 220 espèces de plantes. Cette bactérie ubiquitaire joue un rôle important dans les cycles biogéochimiques de plusieurs écosystèmes en enrichissant son milieu en azote, un élément nutritif limitant, mais essentiel pour tous organismes vivants. Contrairement aux coques ou aux bacilles, les actinobactéries (incluant *Frankia*) ont comme distinction morphologique de croître en colonies filamenteuses appelées hyphes (Benson et Silvester, 1993). La culture de *Frankia* se fait surtout en milieu liquide et dans cette condition, les hyphes se regroupent sous formes caractéristiques d'agrégats visibles à l'œil. La culture et l'étude de *Frankia* est très fastidieuses, car elles ont une croissance lente, avec un temps de doublement

cellulaire entre 15 et 48 heures (Benson et Silvester, 1993) et un génome particulièrement riche en cytosine et en guanine (Normand et al., 1996). *Frankia* engendre la formation de nodules racinaires (Valdés-López et Hernández, 2008) caractéristiques d'une symbiose actinorhizienne réussie, mais peut aussi être sous forme libre dans un sol riche (forme saprophyte) et persister même en l'absence de plants hôtes (Richardson et al., 2000). On retrouve quatre structures dans la croissance de *Frankia*, soit les hyphes végétatifs, les sporanges (chez certaines souches) étant responsables de la dissémination du microorganisme, les vésicules permettant la fixation de l'azote atmosphérique (Benson et Silvester, 1993; Parsons et Fitter, 1987) et des hyphes de reproduction toruleux, une forme de propagule observable en milieu stressé (Bernèche D'Amours et al., 2011; Bissonnette et al., 2014; Diem et Dommergues, 1985).

La symbiose actinorhizienne est une association entre une plante actinorhizienne et une bactérie du genre *Frankia* dans laquelle il y a échange de carbone et d'azote. Cette symbiose est établie selon un mécanisme d'infection connu se produisant à partir du site d'infection, endroit où le contact entre la bactérie et le poil racinaire donne naissance à un nodule. Après établissement de la symbiose, la plante d'une part fournit du carbone issu du procédé de photosynthèse et la bactérie, elle, fournit de l'azote issu de la fixation de l'azote. La fixation de l'azote se produit dans la vésicule de *Frankia*, à l'intérieur du nodule formé au niveau des racines. Cette vésicule est protégée par une membrane lipidique multicouche qui réduit la diffusion de l'oxygène. Des cloisons internes séparent aussi les hyphes végétatifs des vésicules (Pawlowski et Bisseling, 1996). Cette protection contre l'oxygène est nécessaire pour protéger une enzyme sensible à la présence d'oxygène, la nitrogénase. Celle-ci est l'enzyme qui permet à *Frankia* de fixer l'azote atmosphérique (N_2 ou diazote) en ammoniac (NH_3) ou en ions ammonium (NH_4^+) (Wall et al., 2003), assimilables par la plante.

1.6.1. TOLÉRANCE DE L'AULNE ET DE *FRANKIA* SPP. FACE AUX RÉSIDUS MINIERS

Des études sur l'aulne crispé et l'aulne rugueux, exposés à des résidus fins provenant du site Doyon, ont déjà été réalisées (Barrette, 2017). La mise en terre des plantules d'aulne était effectuée en même temps que l'inoculation afin de comprendre comment la symbiose actinorhizienne pourrait s'établir lorsque la plante-hôte et le symbionte étaient simultanément exposés à des résidus acidogènes. Les résultats ont montré que la symbiose était difficilement réalisable dans des sols contenant beaucoup de résidus fins (plus de 35% v/v) comme l'illustre la figure 7.

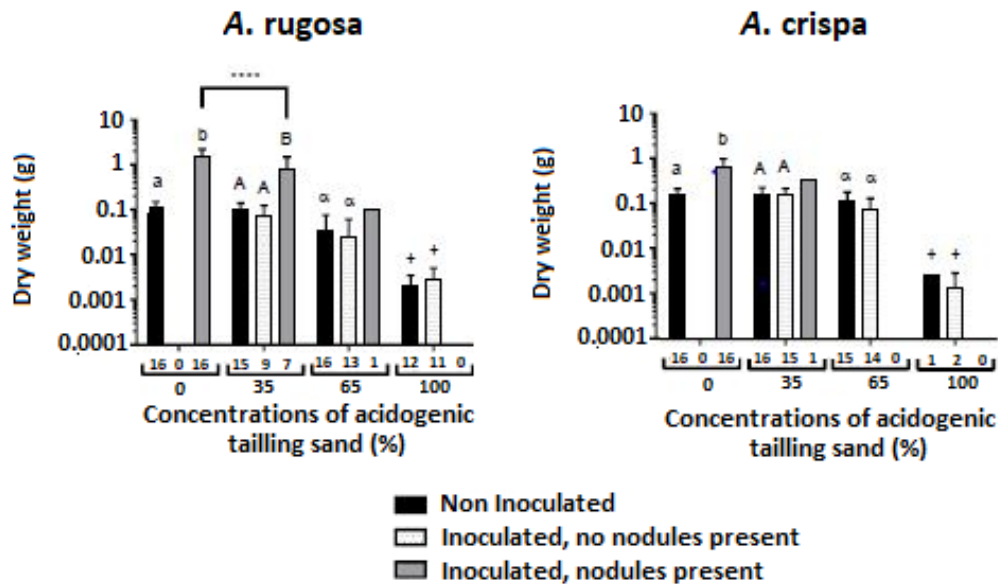


Figure 7. Nombre de nodules pour l'aulne rugueux (*A. rugosa*) et l'aulne crispé (*A. crispa*) ayant été mis en contact avec des résidus fins acidogènes. Tiré de Barrette, 2018.

En effet, comme on peut le voir à la figure 7, le pourcentage de nodulation était de 100% pour l'aulne rugueux et crispé dans le contrôle négatif (sans résidus fins; barres : *inoculated, nodules present*). Ce pourcentage décroît rapidement, plus on augmente le pourcentage de résidus fins. À 35%, on observe des pourcentages de nodulation de 44% et 6% pour l'aulne rugueux et crispé respectivement. À 65% de résidus fins, les auteurs observaient un pourcentage de nodulation de 6% pour l'aulne rugueux et aucun nodule pour l'aulne crispé. À 100% de résidus fins, aucun nodule n'était présent pour les deux espèces. D'autres résultats intéressants concernant la biomasse totale ainsi que la chlorophylle ont été montrés dans cette étude et tendent à proposer que l'aulne rugueux est plus propice à se développer dans une matrice de résidus fins

acidogènes. L'analyse de métaux dans les feuilles a montré qu'il n'y avait pas de différences dans les patrons d'accumulation des deux espèces (Barrette, 2017). Cette étude était très intéressante sachant que les aulnes apparaissent naturellement lors d'une succession autogénique primaire et qu'ils ont déjà été employés avec succès à des fins de phytoremédiation de sites perturbés par les activités humaines (Roy et al., 2007). Mon projet diffère de cette précédente étude, car j'étudierai le DMA, au lieu des résidus fins acidogènes et l'établissement de la symbiose sera effectué avant l'exposition à l'agent stressant. Mon projet vise à évaluer comment des plants d'aulnes réagiraient s'il y avait un déversement de DMA dans l'environnement et si une telle exposition pourrait engendrer un danger de translocation des métaux.

1.7. HYPOTHÈSES

Le projet comporte deux grandes hypothèses de recherche. La première : les souches de *Frankia* sp. ACN10a, *Frankia* sp. Avcl1 et *Frankia alni* ACN14a sont sensibles au DMA produit dans les résidus de la mine Doyon. La deuxième : l'aulne et la souche *Frankia* sp. ACN10a sont plus tolérants au DMA lorsqu'ils sont en symbiose. Cette tolérance pourrait découler d'un changement de l'acquisition et la distribution des microéléments. En perspective, la présence de la symbiose actinorhizienne avec *Frankia* sp. ACN10a pourrait atténuer le stress environnemental associé à l'exposition ponctuelle de l'aulne crispé (*Alnus viridis* spp. *crispa*) et de l'aulne rugueux (*Alnus incana* spp. *rugosa*) au DMA.

1.8. OBJECTIFS

Le projet de recherche se divise en deux grands objectifs. Le premier vise la détermination de la tolérance au DMA de *Frankia* sp. ACN10a, *Frankia* sp. Avcl1 et *Frankia alni* ACN14a. Cet objectif a été réalisé par l'entremise d'essais en microplaques où les différentes souches ont été mises en contact avec différentes concentrations de DMA, à pH ajusté ou non ajusté. Le deuxième objectif vise la détermination de la tolérance au DMA de l'aulne crispé et de l'aulne rugueux avec et sans symbiose actinorhizienne. Un des aspects était la visualisation de la distribution des métaux à l'intérieur de la plante. Ce deuxième objectif a été réalisé grâce à des essais de culture en plantarium où les plantes, inoculées et non inoculées ont été mises, ou non, en contact avec du DMA. Ces deux objectifs devaient être précédés par la réalisation d'un objectif préliminaire visant la caractérisation du contenu en métaux du DMA de la mine Doyon par ICP-MS. Au fil du temps, un sous objectif est venu s'ajouter au premier objectif. Il consistait à évaluer la tolérance au DMA d'autres souches de *Frankia* spp. (11 souches), qui ont été isolées à même le site minier de Doyon. Huit d'entre elles ont été isolées de zones moyennement exposées au DMA et sont apparentées à *Frankia* Cpl1. Les trois autres ont été isolées de zones fortement exposées au DMA et sont apparentées à *Frankia* ACN12a. Ce sous-objectif permettra d'apporter des solutions d'amélioration des techniques de revégétalisation du site minier et permettra de déterminer laquelle des *Frankia* spp pourrait être utilisée pour les essais en culture. Pour terminer, j'aimerais rappeler que la problématique du DMA est bien présente dans l'industrie minière québécoise et que combinée aux différentes lois qui y sont associées, il est primordial d'étudier son effet sur les organismes, afin d'un jour pouvoir revégétaliser correctement ces sites et d'avoir le plus d'outils possible pour pouvoir offrir un moyen efficace et peu coûteux aux industries. De surcroît, il y a des inquiétudes concernant la migration des métaux dans la chaîne trophique et cette

étude permettra de mieux saisir la dynamique chez les jeunes semis d'aulnes, tels ceux colonisant spontanément les sites miniers orphelins.

1.8. DESCRIPTION ET JUSTIFICATION DU PROJET

Ce projet est unique en son genre, car pour une première fois il viendra éclaircir ce qui se passerait si de jeunes plants d'aulnes étaient mis en contact avec du DMA, après établissement de la symbiose actinorhizienne. Il viendra mimer une situation dans laquelle un déversement se produirait, afin de mieux comprendre comment les plantes et les bactéries du milieu réagiraient. Un déversement pourrait être causé, par exemple, par une crue printanière ou encore l'effondrement d'une digue. Un des points forts à tenir en compte est le problème d'accumulation des métaux par les aulnes en cas de déversement. De plus, étant axé sur le DMA, le projet visera à mieux comprendre ce qui se passe sur un site à fort potentiel acidogène, premier problème en importance de l'industrie minière canadienne. Le projet viendra, dans un second temps, donner plus d'information sur ce qui se passe lors de la colonisation naturelle sur un site orphelin, problème criant sachant que le Québec comporte 679 sites nécessitant des travaux de restauration, afin d'en limiter les impacts environnementaux. Ultimement, le projet abordera la possibilité d'utilisation de nouvelles souches de *Frankia*, isolées à même le site minier, en testant leur tolérance au DMA. Il est primordial de bien comprendre la problématique du DMA et ses effets sur les différents organismes utilisés en revégétalisation afin d'utiliser les bons outils pour endiguer le problème, sans risquer de causer d'autres dommages à l'environnement.

CHAPITRE 2

DÉVELOPPEMENT ET HOMÉOSTASIE ÉLÉMENTAIRE CHEZ L'AULNE ACTINORHIZÉ

1. RÉFÉRENCE DE L'ARTICLE ET CONTRIBUTION DE L'AUTEUR

Rodrigue-Morin, M., Gagnon, V., Bellenger, J.P. et Roy, S. ont été des participants actifs à la préparation de l'article «développement et homéostasie élémentaire chez l'aulne actinorhizé». Le premier auteur a été celui qui a effectué toutes les manipulations en laboratoire, réalisé tous les graphiques et a rédigé l'article. De plus, il a mis au point ou adapté les techniques nécessaires aux expériences *in planta* réalisées en conditions contrôlées et les techniques concernant l'utilisation du drainage minier acide comme agent stressant. Vanessa Gagnon a aidé au niveau de la préparation des échantillons ICP-MS et de l'analyse statistique. L'équipe du laboratoire de Jean-Philippe Bellenger a contribué dans la mise au point des techniques concernant le volet chimie et dans l'interprétation des données. Jean-Philippe Bellenger a contribué dans la révision de l'article. Sébastien Roy a supervisé les travaux et révisé le manuscrit.

2. APPORT ET ORIGINALITÉ DE L'ARTICLE POUR LA SCIENCE

L'étude de la symbiose entre l'aulne et *Frankia* est déjà bien décrite, mais jamais une étude n'était venue approfondir comment la distribution des métaux se faisait à l'intérieur de la plante selon la condition d'inoculation et l'âge de la plante. Cela a été réalisé pour l'aulne crispé et l'étude s'est aussi attardée à savoir quelles étaient les différences morphologiques apparaissant pour ces mêmes conditions entre l'aulne crispé et l'aulne rugueux. Ce chapitre, même en lien avec le second objectif de maîtrise, répond à une question plus fondamentale.

3. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

Cette étude a été menée en induisant la symbiose de l'aulne crispé (*Alnus viridis* spp. crispa) et de l'aulne rugueux (*Alnus incana* spp. rugosa) avec *Frankia* ACN10a. La récolte des plants a été faite après 8, 13 et 25 semaines après l'inoculation et les caractères morphologiques comme le SVI, le ratio de biomasse aérienne sur racinaire, l'allocation nodulaire, le nombre et le poids des nodules ont été mesurés afin de voir les différences de développement entre les deux espèces. La moitié des plants n'ont pas été inoculés de manière à voir l'effet de la symbiose aux différents stades. Une analyse de la composition en métaux avec l'appareil ICP-MS a été effectuée sur l'aulne crispé afin de voir les différents patrons de répartition des métaux dans les feuilles, tiges, racines et nodules selon l'âge des plants et le temps post inoculation. Il a été démontré qu'il y avait des différences morphologiques entre les deux espèces au

niveau du SVI et du nombre de nodules. En effet, l'aulne rugueux semble former une plus forte biomasse aérienne et un plus grand nombre de nodules que l'aulne crispé. Il semble aussi former de plus en plus de nodules avec l'âge alors que l'aulne crispé semble atteindre un nombre maximal de nodules plus tôt dans son développement, ce nombre restreint de nodules étant compensé par leurs tailles.

4. MANUSCRIT DE L'ARTICLE

Morphometric and elemental changes in actinorhizal alder shrub seedlings; the cases of *Alnus incana* ssp. *rugosa* and *Alnus viridis* ssp. *crispa*.

4.1. ABSTRACT

This study aimed to characterize the physiological changes in alders in the early stages following symbiosis establishment with their nitrogen fixing symbionts *Frankia* sp. Following inoculation of green alder (*Alnus viridis* spp. *crispa*) and river alder (*Alnus incana* spp. *rugosa*) with *Frankia* sp. strain ACN10a, plants were harvested eight weeks later, 13 weeks later, and 25 weeks later. Morphometric measurements were done to determine aerial biomass, shoot-root dry weight ratio, nodule allocation as well as the number and total weight of nodules to compare how these two Alder species develop in the early stages following contact with the symbiont. Control plants were left non-

inoculated allowing further comparisons into the elemental acquisition and distribution as influenced by the presence of symbiosis. It was shown that both Alder species had significant differences in their aerial biomass and in the number of nodules that formed following inoculation. River alder appeared to develop more aerial biomass and nodules in time, whereas green alder plateaued in the number of nodules earlier in its development and rather invested more biomass in each nodule. This study showed that molybdenum accumulated in the leaves of non-symbiotic alders. Also, it show that some metals (boron and copper) and non-metal (phosphorus) were found in higher concentrations in young nodules hinting at their importance in the early stages of nodule development. Iron and manganese analysis in plants also showed that their concentration increased with plant age. This study begins to shed light on how the actinorhizal symbiosis can influence alder seedling acquisition (or exclusion) and translocation of metals and metalloids; some essential, others toxic.

4.2. INTRODUCTION

Plant growth promoting bacteria are known to significantly change plant biochemistry. Here we endeavoured to characterize the short term response of alder shrub seedlings following the contact and symbiosis establishment with the nitrogen-fixing, Gram-positive soil bacterium *Frankia* sp. (Normand et al., 2014, 1996). Alders throughout the world colonize nutrient poor substrates aided by this symbiosis that can provide 70% to 100% of the plants nitrogen needs (Dawson, 2008). Since frankiae are actinobacteria, alders belong to a group of plants termed actinorhizal plants. These plants are distributed through 24 genera, eight families, representing over 220 species worldwide (Barrette, 2017; Normand et al., 1996; Peret et al., 2007). The 34 species of alders specifically belong to the Betulaceae family and these can be found in a variety

of environments ranging from mountainous to riparian habitats (Nittayajarn and Baker, 1989). Most alder species are found in cold temperate regions of the northern hemisphere and they are capable of contributing in the early successional stages of hostile environments (Normand et al., 1996; Schwintzer & Tjepkema, 1990; Benson & Dawson, 2007; Lefrançois et al., 2010; Roy, Khasa, & Greer, 2007). When in contact with host plants, *Frankia* stimulate the formation of root nodules (Valdés-López and Hernández, 2008) a plant structure where the fixation of dinitrogen will be catalyzed by the frankial nitrogenase to provide assimilable nitrogen, in the form of ammonium, to the host plant (Wall et al., 2003). The contribution of nitrogen fixation of *Frankia* to the environment can occur either as soil dwelling saprophyte's, and has symbionts as well, since approximately 45% of all nitrogen fixed by *Frankia* under symbiosis will return to the environment through leaf fall (Huss-Danell, 1997); (Richardson et al., 2000).

It is therefore understood that *Frankia* play key roles in the biogeochemistry of the environments they colonize. When they are present as nodular endophytes in alder, this role influences the physiology of its host plant to an important, yet poorly characterized, degree. In this study, we began to decipher the changes in microelemental uptake and distribution in plant tissues as a function of the symbiotic status of two alder species. We studied morphometric changes in parallel manner to attempt to understand why and when such changes in elemental homeostasis would occur. Since actinorhizal plants often colonize newly disturbed substrates, which can contain higher levels of microelements, microelemental management in actinorhizal plants is likely important characteristic contributing to their overall fitness in these environments.

4.3. MATERIAL AND METHODS

4.3.1. *FRANKIA* CULTURE

Frankia sp. strain ACN10a was provided by the Centre d'étude de la forêt of Université Laval, Québec, Canada. The strain was cultured in BAPS medium as described previously (Bélanger et al, 2011) and two week-old cultures were used as inoculum. Viability of the syringe homogenized inoculum was confirmed one week prior to culture harvest using epifluorescence microscopy and the LIVE/DEAD® assay (L13152, Molecular Probes®, Ontario, Canada). The day prior culture harvest, culture respiration was measured as described previously (Bélanger et al., 2011) using a tetrazolium salt reduction assay.

4.3.2. PLANTS

Alder plantlets were grown from surface sterilized seeds of two species: *Alnus incana* spp. *rugosa* (river alder) and *Alnus viridis* spp. *crispa* (green alder). Seeds were generously provided by the National Tree Seed Centre in Fredericton, New Brunswick. River alder and green alder seed lots were from Lac Sylans and Quévillon localities in the Abitibi-Témiscamingue region (seedlots 8421683 and 84217.0, respectively). Seed stocks were separated by hexane flotation to retain only viable seeds for subsequent sterilization using hydrogen peroxide and then germination on Murashige and Skoog

medium supplemented with salts and Gamborg's vitamins (Bélanger et al., 2011). Fifteen seeds were plated on each Petri dish and incubated 4 to 5 weeks in a greenhouse where the growing conditions were 16hrs/8hrs (light/dark) at 21°C and 18°C, respectively. Humidity was 70% and light intensity was 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Seedlings were transferred to Magenta® boxes (Shawnee Mission, KS) once they had reached the 1 to 3 leaf stage (five-week germination for green alder, four-week germination for river alder). Eight Magenta® boxes with 2 plantlets each were prepared for each treatment. Boxes contained a sand:perlite mixture (1:1) and these were watered weekly using Hoagland's 0.1X nutrient solution (Xiong et al., 2006) supplemented with 5 ppm nitrogen as KNO_3 . Magenta® boxes were placed in sterile, ventilated polycarbonate boxes as described previously (Bélanger et al., 2011).

Treatments were as follows: inoculated versus non-inoculated, and both types of plants were sequentially harvested 8, 13, and 25 weeks following the day of the inoculation. The inoculation (of half of the total number of plants) was done six weeks following their transfer to Magenta® boxes (4 to 6 leaf stage). *Frankia* strain ACN10a inoculum was delivered at the root collar in 3 mL of Hoagland's nutrient solution 0.1 X supplemented with 5 ppm nitrogen as described above, providing a total amount of 10 μL of packed cell volume (PCV) (Nittayajarn and Baker, 1989) per plant.

4.3.3 HARVESTING PLANTS AND DATA COLLECTION

The day preceding harvest (8, 13, and 25 weeks post inoculation time), total chlorophyll content was estimated via foliar fluorescence using a CCM-300 apparatus (OPTI-SCIENCES, NH, United-States) as described by Gitelson, Gritz, & Merzlyak (2003).

Measurements were done on three leaves for each plant. Plants were removed from Magenta® boxes and rinsed using deionized water to remove sand and perlite. The retrieved sand perlite mixture was kept to determine pH as described by Wilke, Margesin, & Schinner (2005). Plant height and root collar diameter were measured to calculate the Seedling Volume Index (SVI), which is evaluated by multiplying the root collar diameter squared by plant height., roots and nodules were successively rinsed in three EDTA oxalate solutions (for ICP-MS preparation) (per litre: 18.61g EDTA, 13.4 g Na-oxalate, 0.7455 g), followed by a rinse in deionized water. Nodules were counted and weighted such as were leaves, stems and roots following their drying at 70°C (72 hours). These weights were used to calculate aerial biomass to root biomass ratios (A/R). Nodule allocation was calculated by dividing nodule biomass by total plant biomass. Specific Nodule Number (SNN) was calculated by dividing root biomass by the number of nodules. The average nodule weight in a given plant was calculated by dividing the total nodule biomass by the number of nodules.

4.3.4. ICP-MS ANALYSIS OF METALS ALDER

The determination of metals and metalloids content in plant tissues was performed in two steps. First, leaf, stem, root, and nodule biomasses were digested as described elsewhere (Barrette, 2018). Briefly, plant biomass was finely ground in a mortar and pestle using liquid nitrogen. 25 mg of this powder was weighted and the digestion was performed using 2 mL trace metal grade nitric acid (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). 2 mL of nitric acid were added to the sample 30 minutes apart and tubes were incubated in a DigiPrep Jr SCP science digester (SCP Science, Montréal, Canada). For samples that contained higher levels of organic material, an additional digestion incubation at 65°C was performed. Three controls (without sample) were generated two evaluate

background noise from ICP-MS, as well as tube cleanliness. When samples were completely digested, sample volume was brought to 10 mL using MilliQ water (20% residual HNO₃ concentration) and vortexed. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) was performed within one week of sample preparation and some samples were pooled when necessary to obtain the required 25 mg for digestion. Samples were subsequently diluted 10 times using Milli-Q water (2% residual HNO₃ concentration) supplemented with the internal standard (12 ppb Rh). ICP-MS was performed using an XSeries® II (ThermoFisher) for the following elements: boron (B), magnesium (Mg), aluminum (Al), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), scandium (Sc), titanium (Ti), vanadium (V), chromium (Cr), iron (Fe), manganese (Mn), cobalt (Co), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), arsenic (As), selenium (Se), molybdenum (Mo), silver (Ag), cadmium (Cd), antimony (Sb), barium (Ba), tungsten (W), sodium (Na), tellurium (Te) and lead (Pb). The water used in all of these procedures is obtained by triple treatment as described in Darnajoux (2015).

4.3.5. STATISTICAL ANALYSIS

Principal component analysis (PCA) of elemental content was performed using R software v2.15.2 with RStudio, Composition, FactomineR, Stats and Nortest pack (R development core team; <http://www.cran.r-project.org>). This analysis allowed us to determine which were the principal factors that could explain differences observed between samples and which elements were linked to different species or harvest times. The significant differences found between ellipses presented in the following figures were determined using multiple analysis of variance (MANOVA). All morphometric and elemental data were submitted to analysis of variance (ANOVA) to ascertain the presence or absence of statistically significant differences (GraphPad Prism Software,

ver. 6, San Diego, CA). Aerial to root biomass ratio as well as seedling volume index (SVI) data were statistically analysed using two-way anova with Sidacks post-tests. Data for the number of nodules and total nodule biomass were statistically analysed using one-way anova with Tukeys post-test. Elemental content data were analysed using two-way anova with Sidacks post-test, however a decomposed analysis was required due to interactions between factors.

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1. MORPHOLOGICAL GROWTH DIFFERENCES FOR GREEN AND RIVER ALDER

In our study, in order to understand a little more the development of green and river alder, it was important to take a look at the size of the plants (showed by the SVI) and at the symbiosis efficiencies of the plants (showed by the aerial to root biomass ratio (A/R ratio)). Those two parameter are shown in figure A1. SVI data showed that nodulated alder develop, as expected, more aerial biomass than the non-inoculated plants for both alder species (figure A1a and A1b). Seedling volume index also increased with time for both species when plants were inoculated which was not the case for non-inoculated plants. River alder produced more aerial biomass in general compared to green alder. Total plant biomass also followed the same patterns as described above (results not shown). While it had already been observed that river alder produced more biomass than green alder (Barrette, 2018), the present study also demonstrates that SVI followed the same patterns between those two species.

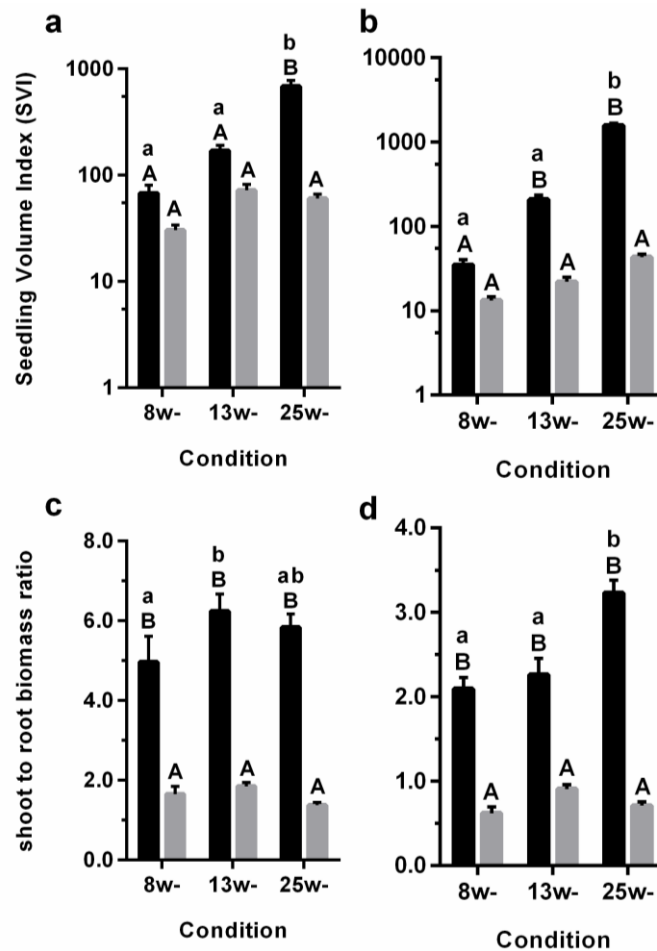


Figure A1. Seedling volume index (SVI) of green (a) and river (b) alder plants. Aerial to root biomass ratio (A/R ratio) of green (c) and river (d) alder plants for inoculated (black bars) and non-inoculated (gray bars) plants 8, 13 and 25 weeks post inoculation. Different uppercase letters represent significant differences between inoculated and non-inoculated plants of a same condition. The different lowercase letters represent significant differences between the different inoculated plants across the three harvest times. The different Greek letters represent significant differences between the different non-inoculated plants across the three harvest times.

Both study are widely corroborating on this point. The aerial to root biomass ratio (A/R) did not differ between species when plants were non-inoculated (figure A1c and A1d). In general, we observed a higher ratio in green alder compared to river alder. The evolution of the A/R ratio differed between species. 13 weeks post inoculation green alder A/R ratio was higher compared to eight weeks post inoculation. This differs from what was observed in river alder, where an increase in the A/R ratio was only observed 25 weeks post inoculation.

Two other parameter that were essential to understand the development of green and river alder were the number of nodules, the total nodule weight and the nodular allocation. Those three are more specific to the symbiosis part of the study and are shown in figure A2. Data for the number of nodules per plant reveal two distinct patterns between alder species. The number of nodules present in green alder varied very little in time following inoculation whereas the number of nodules (infection sites) in river alder increased in time (figure A2a and A2b). It is difficult to determine if this difference is due to a lessen viability of *Frankia* in the green alder rhizosphere, or if the regulation of infection by the host plant differed between species. Interestingly, although the number of nodules differed between species, the total nodule weight increased through time for both alder species. Globally total nodule weight was higher in river alder compared to green alder (figure A2c and A2d). Nodule allocation represents the mass of nodule over total plant biomass. Nodule allocation in green alder followed the same pattern as was found in the number of nodules, which was stable (figure A2e). River alder had increased nodule allocation between eight weeks and 13 weeks post inoculation (figure A2f). Subsequently, this nodule allocation value diminished following 13 weeks post inoculation to return to the values observed at eight weeks post inoculation, at the end of the experiment (25 weeks post inoculation). This drop in nodule allocation followed results observed for the A/R ratio in river alder.

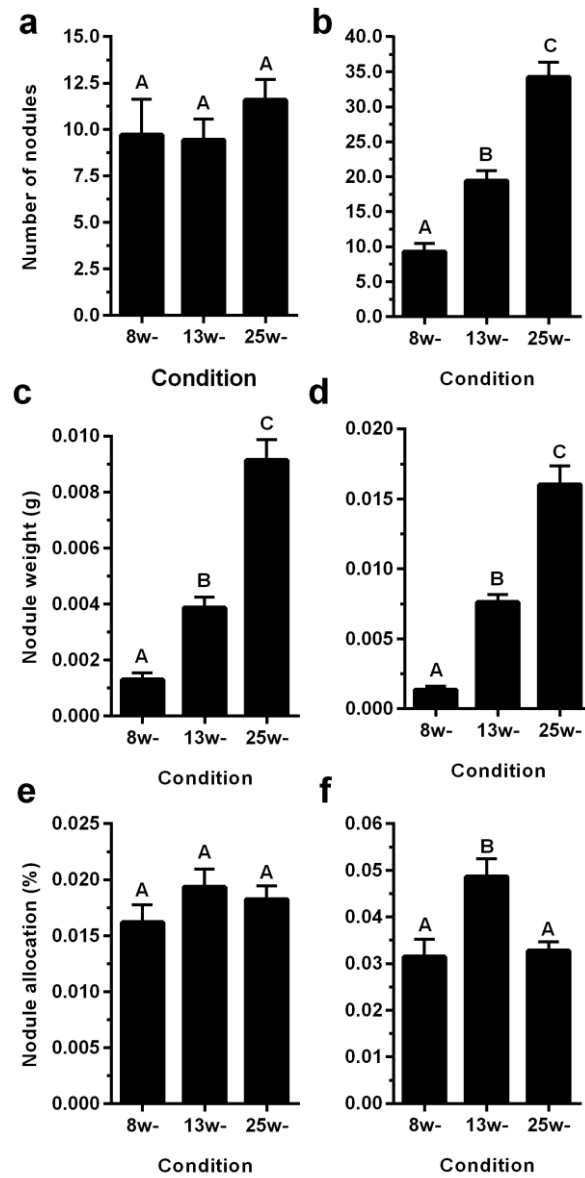


Figure A2. Number of nodules of green (a) and river alder (b), total nodule weight of green (c) and river alder (d) plants and nodular allocation of green (e) and river alder (f) 8, 13 and 25 weeks post inoculation. The different uppercase letters represent the significant differences obtained between the different conditions.

Indeed, at 25 weeks post inoculation the A/R ratio increased as a result of more investment in aerial biomass. When comparing the results of our study with those obtained by Barrette (2018), our A/R ratio are quite lower (approximately 0.02 and 0.04 for green and river alder, respectively) than those observed in that study (over 1.0 for both alder species). One notable methodological difference in the aforementioned study was that alder inoculation was done the day plantlets were transferred from germination Petri dishes to Magenta® boxes. It is possible that the stress of transplantation had a negative impact on the ability of *Frankia* and alder to generate successful infection sites, whereas transplantation stress had not yet had the time to negatively impact the plant as *Frankia* was simultaneously present.

The present study reveals that nodule allocation in river alder had a sharp increase 13 weeks post inoculation. Height and total biomass of plants revealed no significant difference in relation to age or species (results not shown). Only the presence or absence of symbiosis influenced these results. Foliar chlorophyll content (as measured through fluorometer) in both species was similar and slightly increased in time. Inoculated plants always had higher chlorophyll content indices compared to non-inoculated plants as could be expected with the contribution of nitrogen fixation as well as the photosynthate requirements to sustain the endophyte (results not shown). This pattern was also observed previously (Barrette, 2017). Water stress is an additional factor that may have played a role in the chlorophyll content estimates. When occurring, water stress could provoke stomatal closure, which as a direct impact on photosynthesis and inhibition of nitrogenase activity (Dawson, 2008).

4.4.2. OVERALL METAL LEVEL IN GREEN ALDER (PCA)

The following section will present elemental composition (concentration) of leaves, stems, roots and nodules for green alder. Those analysis are essential to understand the overall parameter occurring in plant leaves and development. River alder plant tissues were not analysed due to the lack of resources. Figure A3 represent the results obtained with leaves. PCA analysis revealed that variance in foliar elemental composition could be explained by two axes (figure A3). The horizontal axis explained 46.86% of the variance observed and was mainly associated with the presence of specific metals. The leaves containing more Ag, Tl and Ti tended to accumulate less Cu, Sc, Co, Cd, Ba, Fe and Ni. The vertical axis explained 23.61% of the variance observed and mainly correlated with plant size. As plant size increased (height, total biomass, SVI, total nodule weight, and chlorophyll content), values increased for SNN, A/R ratio and Se, Sb and Al content. Such plants also contained less Mo and B and pH of the substrate was also lower. The spherical ellipse associated with inoculated plants showed that variance was not explained by either axis and only a very low correlation with horizontal axis could be noted. This ellipse was however located higher on the vertical axis showing that inoculated plants were larger (height, total biomass, SVI, total nodule weight, and chlorophyll content) as well as having a higher SNN and A/R ratio. These plants also contained more Al, Se, Sb, Cr, Ni and Fe. The ellipse associated with non-inoculated plants was located lower on the graph showing that these plants frequently had higher levels of Ag, Mo and B in their leaves. The horizontal arrangement of the ellipse of the non-inoculated plants shows that these plants will mainly see their variance explained by the horizontal axis. Multivariate analysis of variance (MANOVA) conducted on both these ellipses revealed a p-value of 0.001, indicating a significant difference between those.

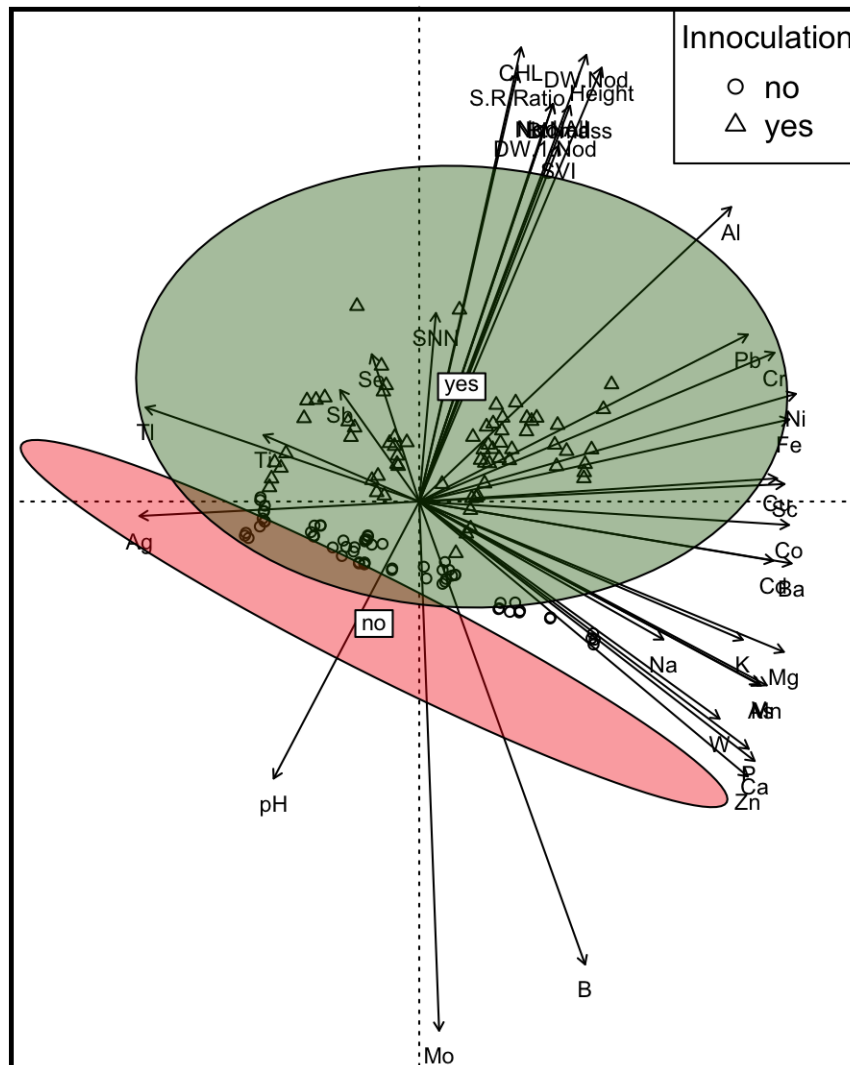


Figure A3. Results of the principal component analysis conducted on green alder leaves. The green ellipse represents an agglomeration of plants having been inoculated with *Frankia* sp. strain ACN10a and the red ellipse those that have not been inoculated. (Made using R software)

That same analysis has been made with the stems of the plants (figure A4). It showed that the horizontal axis explained 50.81% a variance and was primarily linked to the presence of certain metals. Notably, plants containing more Ag, Sb, Ti and Se contained less Mo, Ca, P, V, Mg, B, W, K, Cu, Fe, Zn, Mn and Cr. The vertical axis explained 16.02% of the variance and mainly correlated with plant development. As plants were larger, they contained more As, less TI in their stems and pH of the substrate was lower. Without regard for axes, certain morphometric results such as average nodule weight, number of nodules, nodular allocation, and A/R ratio, correlated with chlorophyll content and negatively correlated with the presence of Mo, Ca, P and higher pH. The ellipse associated with inoculated plants shows that variance was mostly distributed as a function of the vertical axis. Located to the right of the graph, this ellipse shows that inoculated plants were larger, had a higher A/R ratio and a higher chlorophyll content. These inoculated plants also had higher levels of Ag, Ti, Sb, Se and TI in their stems. The horizontal arrangement of the ellipse of non-inoculated plants shows that these plants will mainly see their variance explained by the horizontal axis. Located to the left of the graph, this ellipse demonstrates that these plants will tend to have higher levels of Mg, B, W, K, Cu, V, Ca and Mo. MANOVA analysis performed for both ellipses produced a p-value of 0.001, indicating a significant difference between the elemental composition of stems in inoculated alder compared to that of non-inoculated alder.

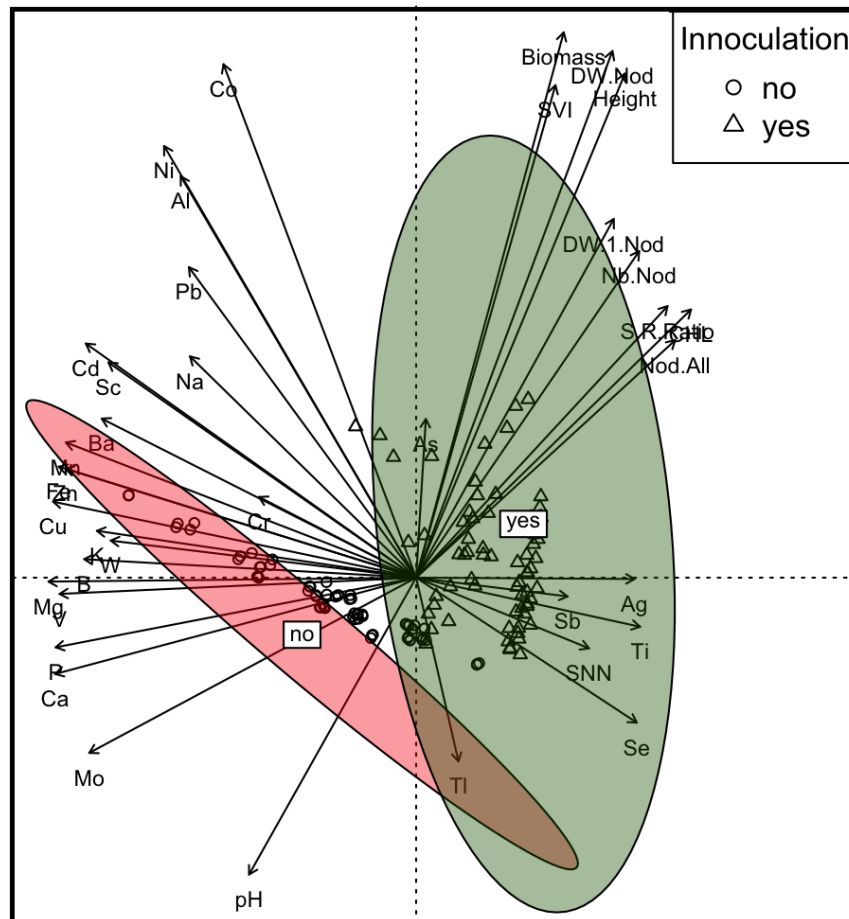


Figure A4. Results of the principal component analysis conducted on green alder stems. The green ellipse represents plants inoculated with *Frankia* sp. strain ACN10a and the red ellipse represents those that were not inoculated. Made from R. software.

Next figure (A5) represent the results of the principal component analysis conducted on green alder roots. It reveals that 23.42% of the variance found in elemental composition data was linked to the presence of certain metals. Plants that contain more

Cu in their roots tended to accumulate less V, Se, Al and Cd in their roots. The vertical axis explained for 23.2% of the variance observed and appeared to also be correlated to the presence of specific metals. It was observed that when root plants contained more K, B, P and Mg, these contained less Fe, Pb, Ti, Ni and Co. Contrarily to what was observed in the case of leaf and stem elemental composition, where elemental composition could be explained by only one axis, root elemental content appears to be explained partly by both axes. Nevertheless, we can note that larger plants had higher values for symbiosis-related parameters (A/R ratio and SNN), higher chlorophyll content, Ba, Sb, Co, Ni and Sc as well as a lower substrate pH. The spherical ellipse associated with inoculated plants revealed that the variance observed could not be explained by either axis. However, its location high in the graph illustrates that inoculated plants were larger, had higher scores for symbiosis related parameters, higher chlorophyll content as well as higher levels of Fe, Ti, Pb, Ni, Co, Sb, Sc, and Cu in the roots. The variance observed in the elongated non-inoculated ellipse could not be explained by either axis, however it's low position in the graph shows that non-inoculated plants will tend to have higher concentrations of V, Al, Se, Cd, Na, W, Cr, K, P, B, Mg, Mo in their roots and higher substrate pH (figure A5). MANOVA performed on these ellipses revealed a p-value of 0.001, indicating significant differences between inoculated and non-inoculated plants in regards to the elemental composition of their root tissues.

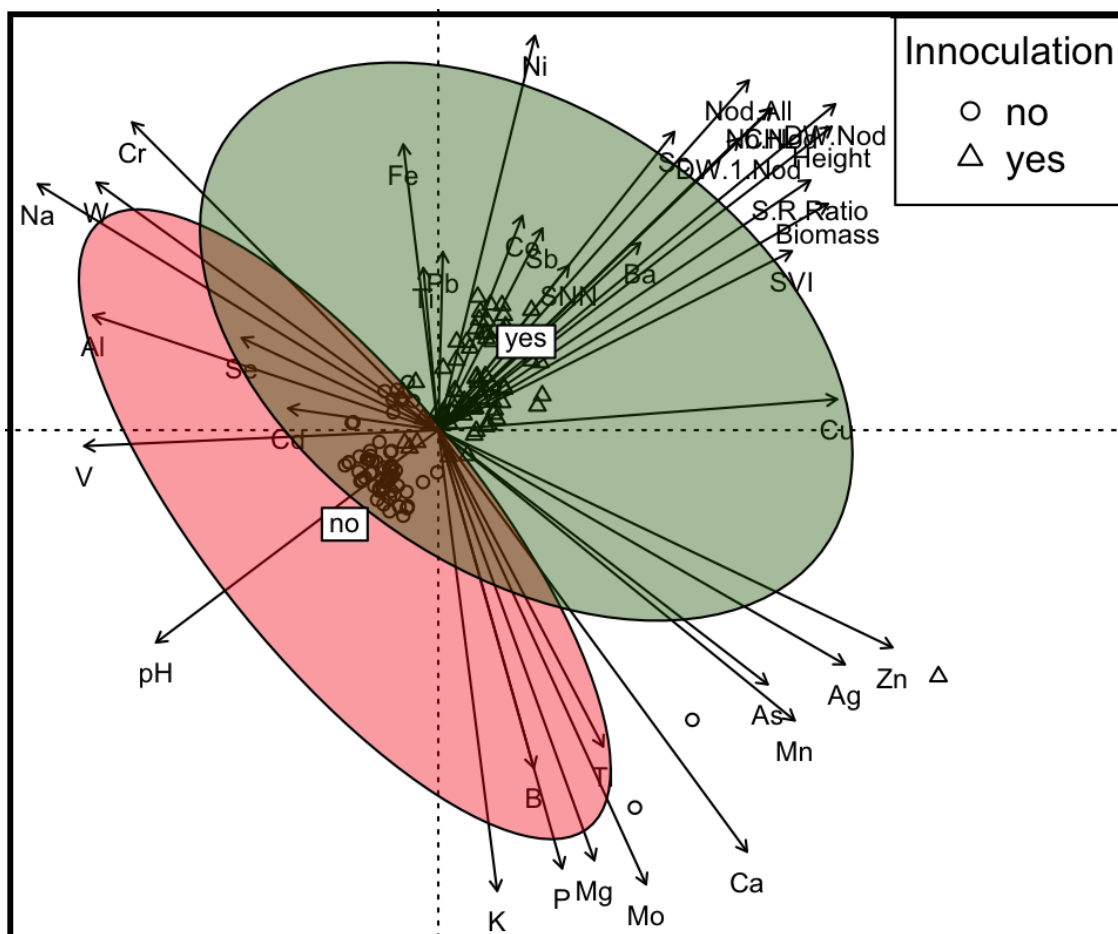


Figure A5. Results of the principal component analysis conducted on green alder roots. The green ellipse represents of plants inoculated with *Frankia* sp. strain ACN10a and the red ellipse represents those that were not inoculated. (Made using R software)

Finally, figure A6 show the results of the principal component analysis conducted on nodules of green alder. Analysis on data from nodule tissues was different because plants in the data set were inoculated. A comparative analysis was therefore conducted

across different post inoculation times (figure A6). The horizontal axis could account for 47.77% of the variance observed and was mostly linked to the presence of certain metals and certain morphometric data related to symbiosis. As an example, nodules tissues containing more Se, a higher A/R ratio, a higher nodule allocation, and a higher chlorophyll content, also attended to contain less of the following elements : Na, Mo, Ca, V, Cu, Ag, Ti, Zn, Sb, and Mg. The vertical axis could explain 17.28% of variance and mostly correlated to plant size as well as the presence of certain metals. When plants were larger (height, total biomass, SVI, nodule weight), the nodules had more Mn, Cd, and Ba. These also contained less W, K, B, and P, and had lower substrate pH and SNN. The vertical location of the ellipse representing inoculated plants harvested eight weeks post inoculation (d1) showed that variance for the samples correlated with the vertical axis. Its high location in the right of the graph indicates that these nodules contained more B, P, Ti, W, Na, and Mo. The ellipses associated with plants inoculated and harvested 13 (d2) and 25 weeks post inoculation (d3) showed that the variance was mostly explain by the horizontal axis. Due to its central position, ellipse d2 indicates that these plants did not have notable patterns in elemental content. Ellipse d3 shows that these nodules contained more Se, Co, Fe, Al, Pb, Ba, Ni, Cd, and Mn, and were larger. Metals for which notable patterns emerged following PCA analysis were graphed and a decomposed two-way ANOVA was performed to determine which differences were statistically significant. Only data that showed interesting patterns are presented here.

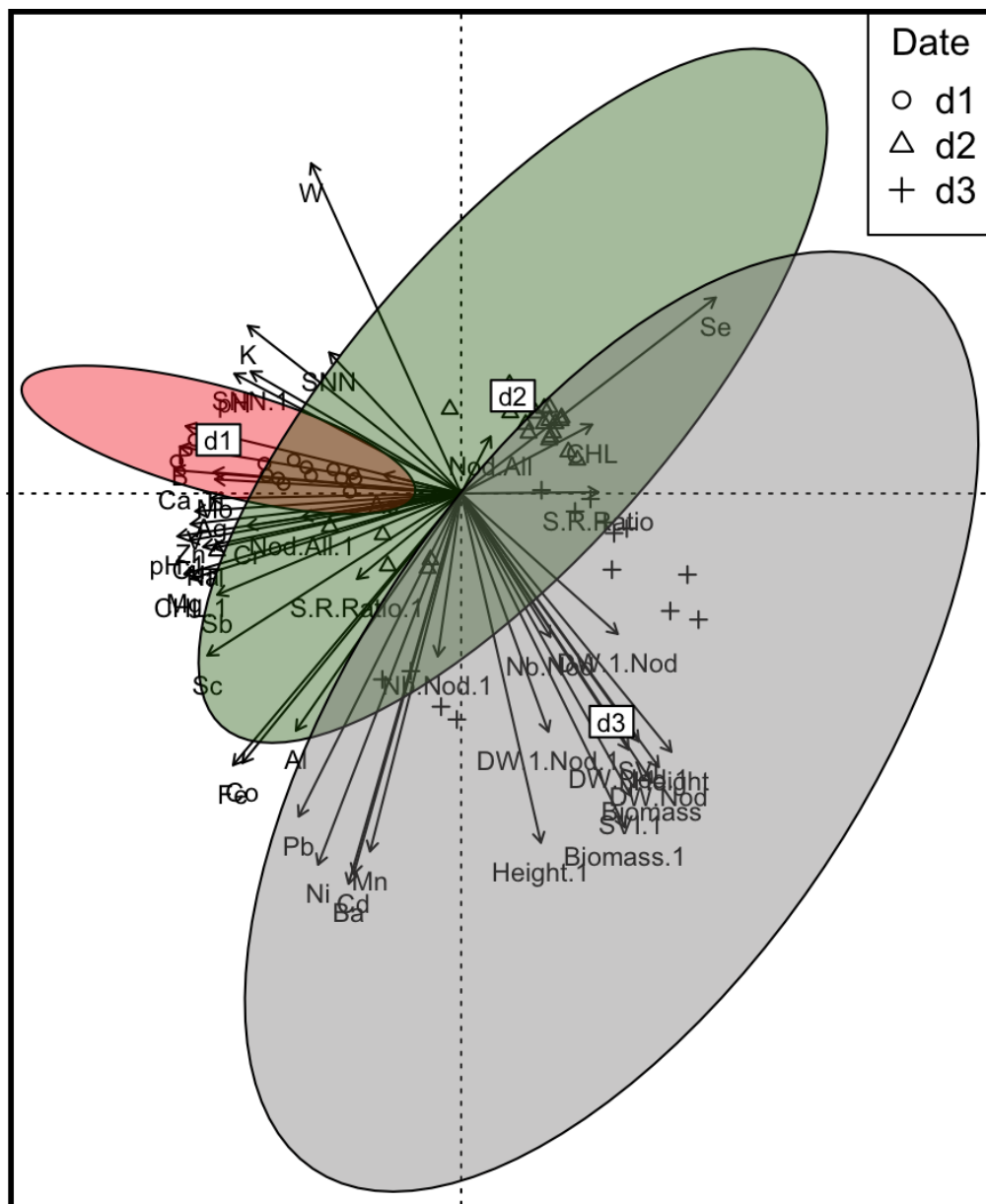


Figure A6. Results of the principal component analysis conducted on nodules of green alder inoculated with *Frankia* sp. strain ACN10a. The red ellipse represents plants that were harvested at 8 weeks (d1). The green ellipse represents those harvested at 13 weeks (d2) and the gray ellipse represents those harvested 25 weeks post inoculation (d3). (Made using R software)

4.4.3. METALS IN LEAVES, STEMS, ROOTS AND NODULES BY AGE AND SYMBIOTIC STATUS

4.4.3.1. MOLYBDENUM, BORON AND PHOSPHORUS

After PCA analysis that showed interesting patterns present in plants parts, it has been possible to choose between all the metals which one was the more interesting and put them into graphics. Nine metals were chosen. For Mo, leaf tissue analysis showed that non-inoculated alders always had higher concentrations of this metal compared to those of inoculated plants (figure A7A1 to A7A4). This concentration in non-inoculated alder leaf tissues also rose in time, whilst it remained stable in the leaf tissues of inoculated alders. Stem Mo concentrations was higher when plants were harvested eight weeks post inoculation and the concentration of Mo tended to diminish subsequently. 25 weeks post inoculation, Mo concentrations in stems were similar to those in leaves. At root level, there was no significant difference in Mo content between alders that had been inoculated compared to alders that had not been inoculated when all these were harvested eight weeks post inoculation. The difference in Mo content in root tissues reappears between inoculated and non-inoculated plants when these are harvested 13 weeks or 25 weeks post inoculation time. Globally, the Mo content in roots is lower than that found in leaves and stems. In nodulated plants, the Mo concentration was higher in nodule tissue compared to leaf tissue. In non-inoculated plants, the Mo content in leaves was comparable to those measured in nodules of inoculated plants.

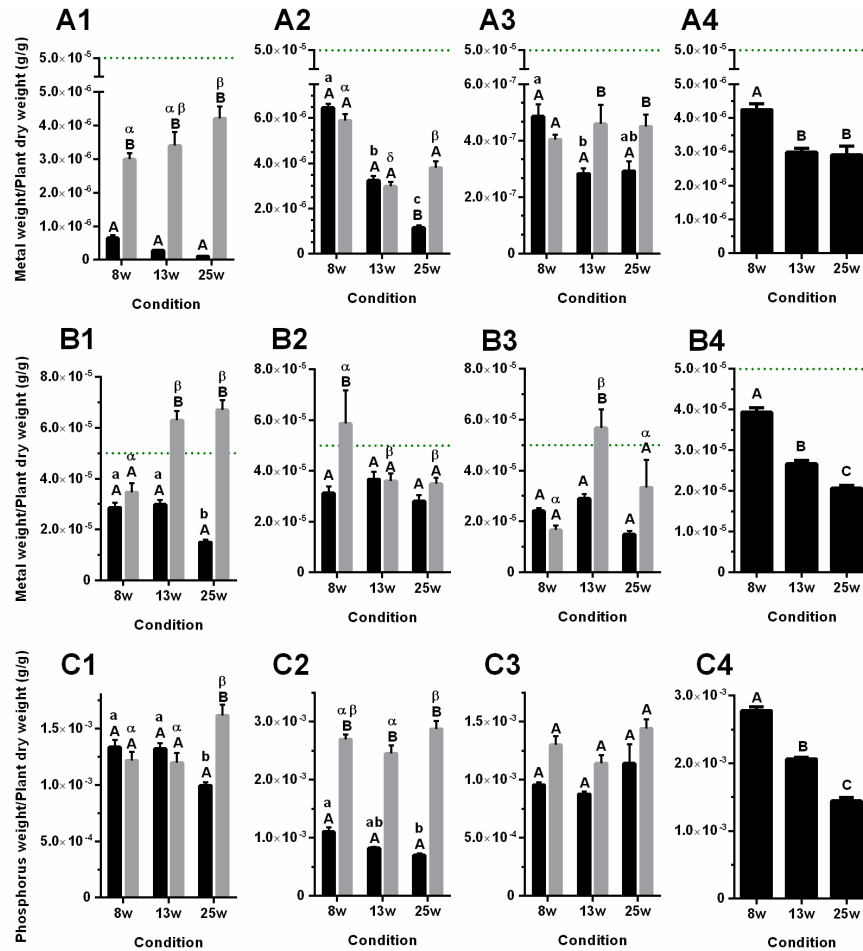


Figure A7. Mo (A), B (B) and P (C) concentrations in leaves (1), stems (2), roots (3), and nodules (4) of inoculated (black bars) and non-inoculated (gray bars) green alder harvested 8, 13 and 25 weeks post inoculation. Concentrations are expressed in g/g (mass of metal / mass of leaves, stems, roots or nodules). The different uppercase letters represent significant differences between inoculated and non-inoculated plants of a same condition. The different lowercase letters represent significant differences between inoculated plants across three harvest times. The different Greek letters represent significant differences between non-inoculated plants across the three harvest times. The dotted green lines (if

present) represent the general toxicity threshold for plants according to Kabata-Pendias (2001).

Mo is indeed essential to the nitrogenase enzyme and it has been shown that diazotroph produce specific transport and exclusion systems to regulate Mo acquisition (Kraepiel and al., 2009). Since this metal is essential to the efficiency of the actinorhizal symbiosis, it appears it could be pooled in nodule tissue to ensure its availability. At plant level, this metal is likely acquired passively. As previously hypothesized, even in the absence of symbiosis, alders could still acquire Mo and translocate this element to leaf tissues (Bélanger and al., 2015). A pool of Mo in leaf tissues could serve to enhance the bioavailability of this important metal to soil dwelling nitrogen fixers that could in turn provide assimilable nitrogen to alder at the soil level. It is also noteworthy in the present study that Mo levels did not surpass the general toxicity level known for plants.

In the case of B (figure A7B1 to A7B4), it was noted that higher levels were found in nodules when plants were harvested eight weeks post inoculation compared to those harvested 25 weeks post inoculation. This could be expected as B is known to stimulate nitrogen fixation in bacteria and is also recognized as an essential nutrient for nodule development (Kabata-Pendias, 2011). The B reduction in plantlets nodule of alder could be explained by a reduced need for this element once the infection step of symbiosis establishment is completed. This hypothesis is coherent with the plateaued number of nodules when comparing green alder that were harvested eight, 13, and 25 weeks post inoculation. In leaves and roots of non-inoculated plants, we observed higher levels of B as time increase. This could be explained by the passive mechanism of B acquisition that would produce higher levels of this element in non-inoculated alder

with the passage of time (older plantlets), attaining levels that are higher than the general toxicity concentration known for plants. The absence of symbiosis in non-inoculated plants could explain the distribution in aerial tissues compared to what was found in nodulated alder.

Young nodulated plantlets (eight weeks post inoculation) had higher P levels in their nodule tissue compared to that observed in older plantlets (25 weeks post inoculation). A similar reduction of P content in time was also observed in their leaf and stem tissues, however this was less pronounced. Non-inoculated plants had higher P levels in stems in all conditions. High levels of P were also found in the leaves of non-inoculated alders harvested 25 weeks post inoculation time (figure A7C1 to A7C4). P is known to be essential in root development (SIAAP, 2004; The Role of Phosphorus in Agriculture, 1980), but it is also a key nutrient for the host plants of endophytic nitrogen fixing bacteria, as these host plants have high energetic requirements. This could explain that older inoculated plants had lower levels of P in nodule, leaf, and stem tissues as symbiosis developed, and observation most apparent in inoculated plants harvested 25 weeks post inoculation. This explanation could be supported by the observation that nodulated plants had a very developed root system that appeared to have expired all soil prospection possibility in these 400 mL Magenta® boxes. It is possible that P availability was becoming a limiting factor for these plants.

4.4.3.2. ALUMINUM, NICKEL AND COBALT

Ni levels in the leaves and stems of inoculated plants increased with plant age. In the case of non-inoculated plants, an increase in Ni foliar levels was only significantly different when plantlets were harvested 25 weeks post inoculation. In roots and nodules of inoculated plants, Ni levels tend to be higher than those found in aerial tissues (figure A8A1 to A8A4). Ni can be an essential element for plants and some microorganisms. In plants it is present in urease (Marschner, 1998) and in bacteria, it may be essential to certain enzymes such as dehydrogenases (Hausinger, 1994; Ragsdale, 1998). In *Frankia*, it is believed that Ni can induce higher nitrogenase activity through a more efficient synthesis of uptake hydrogenases (Wheeler and al., 2001). It can therefore be expected that alders, as actinorhizal host plants, could benefit from Ni accumulation in their tissues. In the present study the levels of Ni found to exceed the general toxicity levels for plants.

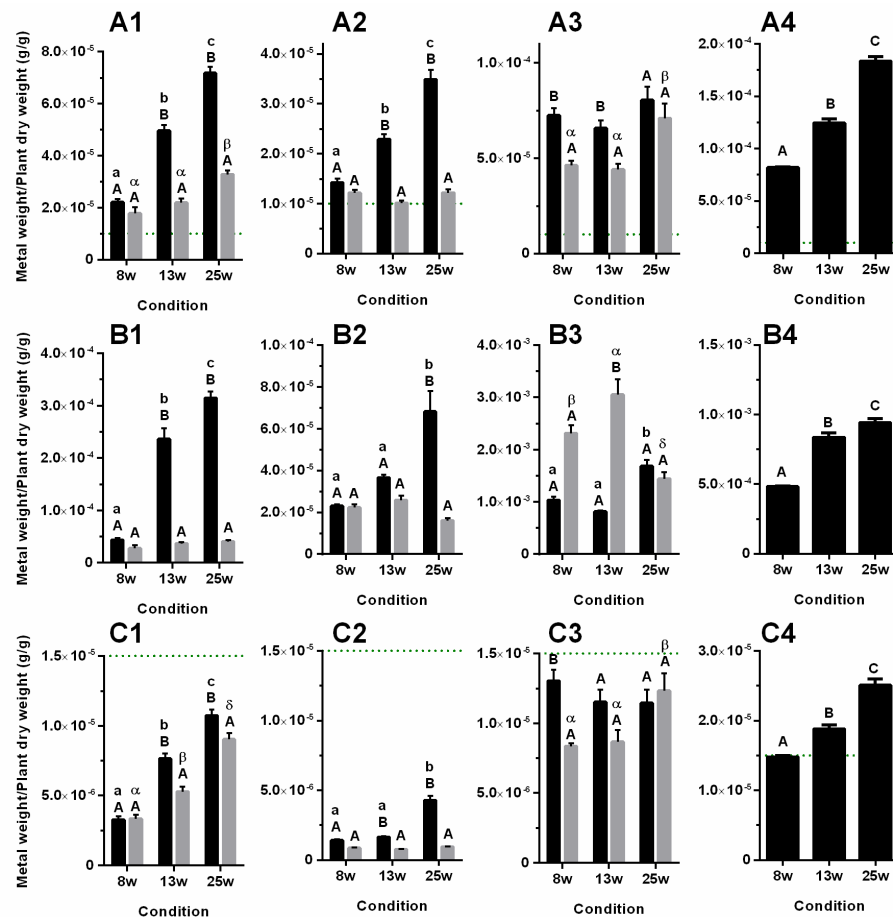


Figure A8. Ni (A), Al (B) and Co (C) concentrations in leaves (1), stems (2), roots (3) and nodules (4) of inoculated (black bars) and non-inoculated (gray bars) green alder harvested 8, 13 and 25 weeks post inoculation. Concentrations are expressed in g/g (mass of metal / mass of leaves, stems, roots or nodules). The different uppercase letters represent significant differences between inoculated and non-inoculated plants of the same condition. The different lowercase letters represent significant differences between inoculated plants across the three harvest times. The different Greek letters represent significant differences between non-inoculated plants across the three harvest times. The dotted lines

(if present) represent general toxicity threshold for the plants (green line) according to Kabata-Pendias (2011).

In the case of Al (figure A8B1 to A8B4), we observed that plants have a pronounced increase in the accumulation of this element when inoculated. This is not observed in non-inoculated alders. Since Al is an essential metal for plants (Kabata-Pendias, 2011) and is also known to stimulate *Frankia* growth (Igual and Dawson, 1999), these observations are physiologically coherent with what is known regarding the biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Since we observed higher levels of Al in the leaves and stems of inoculated plants, it is possible that the active acquisition of this metal occurred via Fe transportation systems (Davis and al., 1971; Gascoyne and al., 1991; Guida and al., 1991; Hu and Boyer, 1996), as inoculated plants would have higher Fe requirements due to nitrogenase (Marschner, 1995b), photosynthesis (Scharf and al., 1994), DNA (Johnson and Wood, 1990) and ATP (Husaini and Rai, 1992). The opposite was observed in roots from inoculated alders harvested eight weeks post inoculation and in 13 weeks post inoculation where Al levels were lower compared to those found in roots of non-inoculated alder. It therefore appears that this element would be retained root level in inoculated plants. Plants have two resistance mechanisms to manage Al; exclusion and tolerance. In the case of exclusion, Al is immobilized outside the root organic acid complexes (malic or citric acid) found in root exsudates. In the case of tolerance, Al has accumulated in the symplasm (Delhaize and Ryan, 1995; Kochian, 1995). Although excessive Al concentrations were not present in the soil used, it appears likely that this second mechanism was involved as this could explain the very high Al levels found in roots of non-inoculated green alder. European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) is known to be Al tolerant (Gordon and Wheeler, 1983).

For Co (figure A8C1 to A8C4), there is an increase in the concentration of inoculated and non-inoculated green alder leaves with age of the plant. A higher Co content was observed in the aerial parts of inoculated plants compared to non-inoculated plants under all conditions except at 8 weeks post inoculation. It is known that Co has a beneficial effect on *Frankia*, since it would be essential for nitrogen fixation (used for vitamin B12 analogue formation) in the symbiont (Huss-Danell, 1997). It is therefore not surprising to see higher Co concentrations in inoculated plants. Co would be passively absorbed by the plant (Kabata-Pendias, 2011) and is essential for them (Hall, 2002, Rout & Das, 2003), as well as for bacteria (Chen et al., 2005; Lima, & Figueira, 2006, Ramírez-Díaz et al., 2008, Summers, 2009, Trajanovska, Britz, & Bhave, 1997).

4.4.3.3. IRON, MANGANESE AND COPPER

The leaves of inoculated alder consistently had higher levels of Fe compared to those of non-inoculated alder. There is a general trend, with plant age, of increased foliar Fe levels in plants regardless of inoculation regime. No particular observations were made for Fe stem concentrations aside that they contained lower levels compared to leaves roots and nodules. Underground tissues (root and nodules) in nodulated plants showed very high Fe levels when compared to stems and leaves (figure A9A1 to A9A4). The presence of siderophores could account for these elevated Fe concentrations in belowground tissues as frankiae are known to benefit from such siderophores (Aronson and Boyer, 1994; Boyer et al., 1999), as Fe is an essential element for nitrogenase function (Kraepiel and al., 2009).

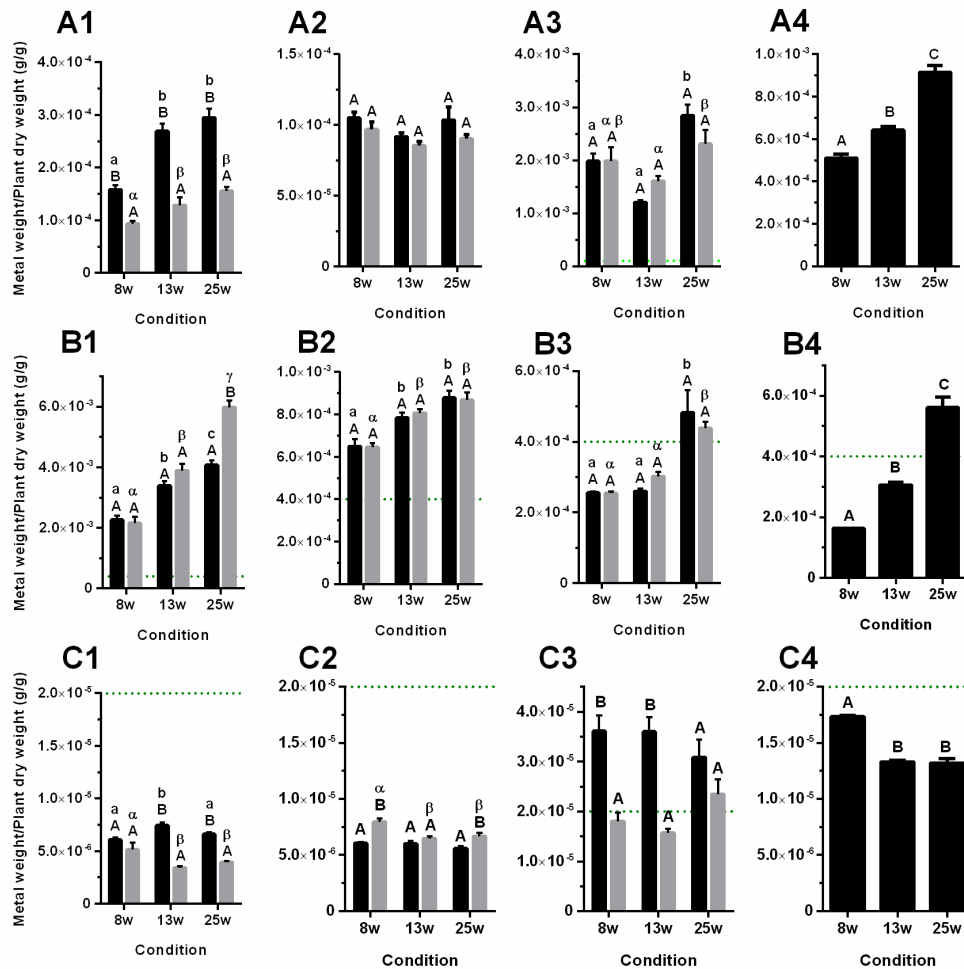


Figure A9. Fe (A), Mn (B) and Cu (C) concentrations in leaves (1), stems (2), roots (3) and nodules (4) of inoculated (black bars) and non-inoculated (gray bars) green alder in at 8, 13 and 25 weeks post inoculation. Concentrations are expressed in g/g (mass of metal / mass of leaves, stems, roots or nodules). Different uppercase letters represent significant differences between inoculated and non-inoculated plants of a same condition. The different lowercase letters represent significant differences between inoculated plants across the three harvest times. The different Greek letters represent significant differences

between non-inoculated plants across the three harvest times. Dotted green lines (when present) represent the general toxicity threshold for plants according to Kabata-Pendias (2001).

As Fe concentrations increase as a function of the age of these inoculated plantlets, it is plausible the level of nitrogen fixation activity (relative to nodule biomass) could have increased during the course of this experiment. It is also known that there is a relationship between Mn and nitrogen uptake by plants, explaining why there is an increase in Mn in roots and nodules for the 25 week post inoculation condition (Przemeck and Schrader, 1981; Yoch, 1979). Mn is an important element for plants, as it is involved in oxido-reduction, photosynthesis and respiration. It is inherently present in chloroplasts and seldom found elsewhere in plant tissues (Kabata-Pendias, 2011). This element was found in very high concentrations in leaves and stems, where levels exceeded the general toxicity levels known for plants. In alder plantlets (25 weeks post inoculation), this general toxic level was also exceeded in roots and nodules. There was a general trend of increasing Mn concentrations with plant age in alders, regardless of the inoculation regime, but Mn levels were highest in leaf tissues (figure A9B1 to A9B4). This is likely explained due to the photosynthetic activity in leaves. Cu is an essential element in plants as it is required for the synthesis of some proteins like lignin, notably enzymes (Bélanger, 2010; Hall, 2002; Rout and Das, 2003). It can be seen that at the root level, even if there are no significant differences between the different post-inoculation times, there are differences between inoculated and non-inoculated plants for plants aged 8 and 13 weeks. For these, the content is higher in inoculated plants. The same patterns has been observe in leaves for 13 and 25 weeks post inoculation (figure A9C1 to A9C4). That could be explain by the fact that Cu plays a significant role in N reduction and fixation, photosynthesis, protein metabolism, cell wall metabolism, respiration and carbohydrate distribution (Kabata-Pendias, 2011) Its acquisition is through active mechanisms and it is known that this element is almost

entirely complexed at the root level in particular to cell walls. This explains why Cu normally has a low mobility in plants (Kabata-Pendias, 2011). The results of this study reflect this expectation as we observed little variation in Cu content following inoculation (as a function of time) and why the highest concentrations of this element was found in belowground tissues. Concentrations in root tissues that we observed often exceeded the general toxicity level known for plants, and was near these levels in nodule tissues.

4.5 CONCLUSIONS

The aim of this study was to begin characterizing physiological changes in alder seedlings following the establishment of the actinorhizal symbiosis with regard to nutrient acquisition and distribution in plant tissues. River alder developed aerial biomass more quickly, more nodules, and larger nodules compared to green alder. However, green alder had higher nodule allocation and a higher A/R ratio. Higher aerial to root biomass ratio is an indicator of overall efficiency of the symbiosis considering that a reduced investment in root tissue occurs in alders when nitrogen requirements are met mostly by the actinorhizal symbiosis, and not exogenous nitrogen found in soil (Pourhassan an al., 2015). It was interesting to find that green alder appeared to have completed the infection phase of symbiosis establishment earlier following inoculation compared to river alder. This underscores the need to further investigate how these species of interest in the rehabilitation of disturbed environments recruit endophytes. We do not know if the lower number of infection sites in green alder resulted from the regulation of symbiosis by the host plant, which could evidently vary from one species to the next, or whether transplantation stress or exudate quality was different between these two species. Our study has also revealed for the first time that distribution can change in significant matters in the early stages of plant development especially when

in contact with *Frankia* inoculant. The microelemental composition of alder leaves was significantly altered in the presence or absence of an effective nitrogen fixing *Frankia* strain. Our study has also revealed high levels of certain microelements that could reveal their importance for the early stages of the actinorhizal symbiosis between green alder and *Frankia* sp. ACN10a and not only the in vitro culture of *Frankia* strains. We also revealed that Mo, B, P and Cu were found in higher concentrations in young nodules hinting at their importance in the early stages of nodule development. Finally, this study confirmed previous results regarding Mo accumulation in the leaves of non-symbiotic alders (Bélanger et al. 2013). As alders in nature are always (to our knowledge) reported as being nodulated, it would be of interest to investigate if Mo foliar concentrations would be higher in plants with suboptimal nitrogen fixation, for example, when colonized with less efficient *Frankia* strains for nitrogen-fixation.

4.6. ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) through the Programme de recherche en partenariat sur le développement durable du secteur minier. We also acknowledge the contribution of Université Laval that provided access to the *Frankia* collection of Maurice Lalonde (*Frankia* sp. ACN10a) and would like to thank Philippe Venne and René Gagnon for technical support. I would also like to thank Iamgold for their financial support without which I could not have completed this project. We would also like to thank Éric Belleau and Steve Lalancette from Régénération and Evgeniya Smirnova from Centre Technologique en Résidus Industriels (CTRI) for their contributions to the field experiments as well as Sylvain Lortie (Iamgold Corp.), Hassine Bourihane (CTRI) and Simon Thibault (Roche Consultants) for their support and counsel throughout the project. We thank Julie Beaudin for constructive criticism and assistance in preparing the manuscript.

5. REFERENCES

- Aronson, D.B., Boyer, G.L., 1994. Growth and siderophore formation in six iron-limited strains of *Frankia*. *Soil Biol. Biochem.* 26, 561–567.
- Barrette, K., 2017. Étude de la symbiose actinorhizienne chez l'aulne en présence de résidus miniers aurifères acidogènes. M. Sc. thesis, Sherbrooke University, Sherbrooke.
- Barrette, K., 2018. Impacts of heavy metals from gold mine tailing sands on the actinorhizal symbiosis in alders shrubs and risks of metal dispersion during leaf fall. In preparation for ecological engineering.
- Bélanger, P.-A., 2010. Étude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. et sa symbiose avec l'aulne noir (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn). M. Sc. thesis, Sherbrooke University, Sherbrooke.
- Bélanger, P.-A., Bissonnette, C., Bernèche D'Amours, A., Bellenger, J.-P., Roy, S., 2011. Assessing the adaptability of the actinorhizal symbiosis in the face of environmental change. *Environ. Exp. Bot.* 74, 98–105.
- Bélanger, P.A., Bellenger, J.P., Roy, S., 2015. Heavy metal stress in alders: tolerance and vulnerability of the actinorhizal symbiosis. *Chemosphere.* 138, 300–308.
- Benson, D.R., Dawson, J.O., 2007. Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. *Physiol. Plant.* 130, 318–330.
- Boyer, G.L., Kane, S.A., J.A., A., Aronson, D.B., 1999. Siderophore formation in iron-limited cultures of *Frankia* sp. strain 52065 and *Frankia* sp. strain CeSI5. *Can. J. Bot.* 77, 1316–1320.
- Darnajoux, R., 2015. Étude de l'homéostasie des micronutriments de la fixation d'azote au sein de la symbiose lichénique en forêt boréale. Ph.D. thesis, Sherbrooke University, Sherbrooke.

- Davis, W.B., McCauley, M.J., Byers, B.R., 1971. Iron requirements and aluminum sensitivity of an hydroxamic acid-requiring strain of *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. 105, 589–594.
- Dawson, J.O., 2008. Ecology of actinorhizal plants, in: Dawson, J.O., (Eds) , Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbiosis, Springer, Urbana-Champaign, IL, U.S.A., pp. 199–234.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiol. 107, 315–321.
- Gascoyne, D.J., Connor, J.A., Bull, A.T., 1991. Capacity of siderophore ? Producing alkalophilic bacteria to accumulate iron, gallium and aluminum. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 136–141.
- Gitelson, A.A., Gritz, Y., Merzlyak, M.N., 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. Journ. of Plant Phys. 160, 271-282.
- Gordon, J.C., Wheeler, C.T., 1983. Biological nitrogen fixation, in: Gordon, J.C., Wheeler, C.T. (Eds.), Forest Ecosystems: Foundations and Applications, Forestry Sciences. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Guida, L., Saidi, Z., Hughes, M.N., Poole, R.K., 1991. Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*. Arch. Microbiol. 156, 507–12.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53, 1–11.
- Hausinger, R.P., 1994. Nickel enzymes in microbes. Sci. Total Environ. 148, 157–66.
- Hu, X., Boyer, G.L., 1996. Siderophore-Mediated Aluminum Uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4044–8.
- Husaini, Y., Rai, L.C., 1992. pH dependent aluminium toxicity to *Nostoc linckia*: studies on phosphate uptake, alkaline and acid phosphatase activity, ATP content, photosynthesis and carbon fixation. J. Plant Physiol. 139, 703–707.

- Huss-Danell, K., 1997. Tansley review No. 93 -Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytol.* 136, 375–405.
- Igual, J.M., Dawson, J.O., 1999. Stimulatory effects of aluminum on in vitro growth of *Frankia*. *Can. J. Bot. Rev. Can. Bot.* 77, 1321–1326.
- Johnson, A.C., Wood, M., 1990. DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3629–33.
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants. CRC Pulawy, Poland.
- Kochian, L. V, 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237–260.
- Kraepiel, A.M.L., Bellenger, J.P., Wichard, T., Morel, F.M.M., 2009. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals.* 22, 573–581.
- Lefrançois, E., Quoreshi, A., Khasa, D., Fung, M., Whyte, L.G., Roy, S., Greer, C.W., 2010. Field performance of alder-*Frankia* symbionts for the reclamation of oil sands sites. *Appl. Soil Ecol.* 46, 183–191.
- Marschner, H., 1998. Mineral nutrition of higher plants, Academic P. ed., London.
- Nittayajarn, A., Baker, D.D., 1989. Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass. *Plant Soil.* 118, 199–204.
- Normand, P., Benson, D.R., Berry, A.M., Tisa, L.S., 2014. The family *Frankiaceae*, in: Rosenberg, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 339–356.
- Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushenko, L., 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int. J. Syst. Bact.* 46, 1–9.
- Peret, B., Swarup, R., Jansen, L., Devos, G., Auguy, F., Collin, M., Santi, C., Hoher, V., Franche, C., Bogusz, D., Bennett, M., Laplaze, L., 2007. Auxin influx activity is associated with *Frankia* infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*. *Plant Physiol.* 144, 1852–1862.

- Pourhassan, N., Wichard, T., Roy, S., Bellenger, J.P., 2015. Impact of elevated CO₂ on metal homeostasis and the actinorhizal symbiosis in early successional alder shrubs. *Environ. Exp. Bot.* 109, 168–176.
- Przemeck, E., Schrader, B., 1981. The effect of manganese nutrition on nitrogen assimilation in roots. *Plant Soil.* 63, 5–9.
- Ragsdale, S.W., 1998. Nickel biochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 208–15.
- Richardson, D.M., Allsopp, N., D'Antonio, C.M., Milton, S.J., Rejmanek, M., 2000. Plant invasions-the role of mutualisms. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 75, 65–93.
- Rout, G.R., Das, P., 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. zinc. *Agronomie.* 23, 3–11.
- Roy, S., Khasa, D.P., Greer, C.W., 2007. Combining alders, frankiae, and *mycorrhizae* for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Can. J. Bot.* 85, 237–251.
- Scharf, R., Mamet, R., Zimmels, Y., Kimchie, S., Schoenfeld, N., 1994. Evidence for the interference of aluminum with bacterial porphyrin biosynthesis. *Biometals.* 7, 135–41.
- Schwintzer, C.R., Tjepkema, J.D., 1990. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants, Press Academic, Mishawaka, IN, U.S.A.
- SIAAP, 2004. Quel est le rôle du phosphore dans la plante ?. URL <http://bouesseineaval.siaap.fr/?p=46> (accessed 1.28.17).
- The Role of Phosphorus in Agriculture, 1980. , ACSESS publications. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- Valdés-López, O., Hernández, G., 2008. Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: What about legumes?. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1213–1222.
- Wall, L.G., Valverde, C., Huss-Danell, K., 2003. Regulation of nodulation in the absence of N₂ is different in actinorhizal plants with different infection pathways. *J. Exp. Bot.* 54, 1253–1258.

- Wheeler, C.T., Hughes, L.T., Oldroyd, J., Pulford, I.D., 2001. Effects of nickel on *Frankia* and its symbiosis with *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Plant Soil. 231, 81–90.
- Wilke, B.M., Margesin, R., Schinner, F., 2005. Monitoring and assessing soil bioremediation, Soil Biology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Xiong, Z.-T., Liu, C., Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 273–280.
- Yoch, D.C., 1979. Manganese, an essential trace element for N₂ fixation by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*: role in nitrogenase regulation. J. Bacteriol. 140, 987–95.

CHAPITRE 3

MESURE DE LA PLASTICITÉ DE L'AULNE, DE *FRANKIA* SPP. ET DE LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE FACE AU DRAINAGE MINIER ACIDE

1. RÉFÉRENCE DE L'ARTICLE ET CONTRIBUTION DE L'AUTEUR

Rodrigue-Morin, M., Gagnon, V., Bellenger, J.P. et Roy, S. ont été des participants actifs à la préparation de l'article « mesure de la plasticité de l'aulne, de *Frankia* spp. et de la symbiose actinorhizienne face au drainage minier acide ». La plupart des travaux ont été réalisés par le premier auteur qui a mis au point ou adapté les techniques nécessaires aux expériences *in planta* réalisées en conditions contrôlées et les techniques concernant l'utilisation du drainage minier acide comme agent stressant. Le premier auteur a aussi effectué toutes les manipulations en laboratoire, réalisé tous les graphiques et a rédigé l'article. L'équipe du laboratoire de Jean-Philippe Bellenger a contribué dans la mise au point des techniques concernant le volet chimie et dans l'interprétation des données. Jean-Philippe Bellenger a contribué dans la révision de l'article. Sébastien Roy a supervisé les travaux et révisé le manuscrit.

2. APPORT ET ORIGINALITÉ DE L'ARTICLE POUR LA SCIENCE

L'étude de la symbiose entre l'aulne et *Frankia*, mise en contact avec différents contaminants a déjà été étudié et ce dans plusieurs études (Roy et al., 2007; Quoreshi et al, 2007, Lefrancois et al, 2010, Bélanger et al, 2011b; Bissonnette et al, 2014). Plus récemment, ces études ont été enlignées vers l'étude des résidus miniers acidogènes de la mine de Doyon et leurs effets sur l'établissement de la symbiose de l'aulne en les conditions gnotobiotiques. Cette étude montrait comment la symbiose pouvait s'établir en contition stressante et l'analyse chimique de la composition des feuilles a permis d'évaluer les risques de la translocation des métaux du sol (des résidus miniers) vers les parties aériennes des plantes (Barrette 2018). Le présent travail s'en distingue, car l'exposition au drainage minier (agent stressant) a été effectuée après l'établissement de la symbiose, et ce afin de simuler un déversement. C'est justement cette simulation qui apporte une grande originalité au présent travail. Cette façon de faire tentait de simuler ce qui se passerait lors d'un déversement sur des plantes déjà bien établies dans un site à risque de déversement. Des expériences *in planta* en conditions gnotobiotiques ont permis de mesurer l'effet de la symbiose aulne-*Frankia* sur le développement végétal d'aulnes subissant un stress causé par le DMA, en excluant l'interférence de tout autre microorganisme. Par la suite, l'analyse chimique de la composition des feuilles et des autres parties de la plante chez l'aulne nous a permis d'évaluer les risques de la translocation des métaux du sol vers les parties aériennes des plantes. Ces travaux ouvrent la voie à des études terrain pour la revégétalisation de sites étant à risque de déversement de DMA (crue printanière, déversement de digue, etc) afin de voir si le risque de translocation est présent.

3. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

La présente étude a été menée en induisant la symbiose de l'aulne crispé (*Alnus viridis* spp. *crispa*) et l'aulne rugueux (*Alnus incana* spp. *rugosa*) avec *Frankia* ACN10a avant l'ajout de drainage minier acide (DMA) provenant de la mine Doyon (Abitibi-Témiscamingue) comme agent stressant. Par la suite, la tolérance des différentes espèces face au DMA a été étudiée. L'étude a révélé que c'est en grande partie la bactérie *Frankia* et la symbiose qui sont affectées lors de l'ajout de DMA. Une fois la symbiose établie, *Frankia* aurait un effet régulateur tant au niveau morphologique que sur la distribution des métaux. Pour des plants âgés de six mois, il a été démontré que même s'il y avait accumulation de certains métaux dans les feuilles, cette accumulation était grandement réduite lorsque la symbiose était bien établie. L'aulne en symbiose a le grand avantage de pouvoir enrichir le sol en azote et des essais sur le terrain ont montrés que ceux-ci sont aptes à se développer à même les haldes de stériles.

4. MANUSCRIT DE L'ARTICLE

Measuring the plasticity of alders, *Frankia* spp. and actinorhizal symbiosis following exposure to acid mine drainage

4.1. ABSTRACT

The present study was conducted by inducing symbiosis in river alder and green alder using *Frankia* sp. ACN10a before exposing these plants to acid mine drainage (AMD) collected on Doyon mine in the Abitibi-Témiscamingue region. Subsequently, the tolerance of these species to DMA was studied. Results showed that it is largely *Frankia* and the actinorhizal symbiosis that are affected in the presence of AMD. On the other hand, once symbiosis was established, plant morphology and metal translocation were similar to nonexposed alder. For plants of six months of age, it was shown that even if heavy metal accumulation in leaves was found, this accumulation was greatly reduced in the presence of symbiosis. Alders are known to enrich the soils they colonize with nitrogen rich leaf litter and they have shown great potential to thrive in nutrient poor and generally hostile environments.

4.2. INTRODUCTION

Human activity can disperse many contaminants in the environment and the mobility of these contaminants are relatively correlated to their bioavailability. In the mining industry, it is of great importance to understand the environmental issues that are associated with acidogenic tailings. Our study aimed at measuring the potential translocation of such metals in alders that would be used for mine reclamation. We also endeavoured to evaluate the effect such heavy metal stress could have on the actinorhizal symbiosis. Because this symbiosis between *Frankia* and alder provides a great adaptability to alders through dinitrogen fixation, deleterious effects of metals on this symbiosis could therefore impact alder viability in poor environments (Bélanger, 2010). In a previous study, symbiotic establishment was shown to diminish when heavy metal concentration increased. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP–MS) analysis of metals also revealed that nodulation (presence of symbiosis) had a beneficial effect on the capability of alder to regulate microelemental composition in its tissues (Barrette, 2017). In the present study spot trials were performed on alder species exposed to acid mine drainage (AMD) from the Doyon mine in the Abitibi-Témiscamingue region. Although planting trees and shrubs directly in acidogenic tailings is not currently recommended or currently practiced, natural colonization of mine tailings storage areas occurs frequently. Therefore, this investigation was motivated by the necessity of determining if alders that would be exposed accidentally to AMD could present an environmental issue through the dispersal of heavy metals in the environment through leaf fall and by evaluating the resilience of the symbiosis to a spill. Since AMD is a preponderant issue, our study was performed using AMD and not mine tailings. The methodology used was meant to emulate a punctual exposition of alders to AMD. Such an event could occur following quick thawing in spring or following a dam rupture.

4.3. MATERIAL AND METHODS

4.3.1. SAMPLING, CONSERVATION AND ICP-MS ANALYSIS OF AMD

Native AMD was collected on Doyon mine in the summer of 2014, stored at 4°C in the dark until sterilization via radiation at NORDION (Laval, Canada) and kept at -80°C thereafter. For *Frankia* tolerance assay, irradiated AMD was also filtered using a Whatman qualitative filter paper (SARSTEDT, Newton, NC) over a 0.22 µm SteriTop filter unit (SARSTEDT, Newton, NC). The metal concentration of irradiated and irradiated/filtered AMD was determined using the Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) (XSeries® II, Thermofisher) and PlamaLab software v2.6.1.335. 5 mL of AMD was evaporated and digested in a DigiPrep Jr SCP device (SCP Science, Montréal, Canada) using different temperature. The samples were digested with 2 mL of trace metal grade nitric acid (Fisher Scientific DigiPrep Jr SCP) in a two steps manner, to improve digestion efficiency. The first step lasted 30 minutes and allowed a 45°C plateau to be attained following the addition of one milliliter of nitric acid. After adding a second milliliter of nitric acid, the second plateau lasted 1 to 3 hours attaining 65°C. Once this step was completed the volume was completed to 10 mL with Milli-Q water (see note at 2.6) and this stock solution was then diluted 5000, 10,000, or 100,000 times to make sure not damaging the device. 200 µL of trace metal grade nitric acid was added to attain a final concentration of 2% nitric acid. After that, ICP-MS analysis could begin as described in section 2.6.

4.3.2. *FRANKIA* CULTURE

Frankia sp. ACN10a was isolated from green alder in Tadoussac, Québec, and provided by the Centre d'étude de la forêt of Université Laval. The strain was grown in BAPS medium pH 6.7 (Bélanger et al., 2011b) at 30°C, in the dark, without agitation. Two weeks old cultures were centrifuged 10 minutes at 3440 x g at 4°C, washed twice with sterile saline (NaCl 0.85%), and then homogenized using a 10 mL syringe with a 18 1/2 gauge needle. Prior to harvest, the viability of the cultures were observed under microscope using the LIVE/DEAD® stain according to manufacturer instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA) and cell respiration was measured using the MTS/PMS reagent (Promega, Madison, WI) as previously described (Bélanger et al., 2011a).

4.3.3. TOLERANCE OF *FRANKIA* TOWARDS AMD

Homogenized *Frankia* sp. ACN10a culture was lysed by sonication (SONICS Vibra Cell TM, Model: VCX 130PB (Sonics and Materials Inc., Newtown, CT) for 30 seconds at 40% amplitude. The protein concentration was determined by using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) with a reading at 595 nm with a spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Biochrom, Cambridge, USA) as previously described (Bélanger et al., 2011b). Four 96-well microplates were prepared by adding concentrations of 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 67.5 and 75% (v/v) of filtered AMD (dilutions made in the wells with BAPS 1.33X at pH 6.7). Two microplates were prepared with AMD unadjusted pH (pH around 2.90) and two others with AMD pH adjusted to 6.7. Then, 50 µL of bacterial culture were added to attain a final concentration of 15 µg/mL. Negative control wells received 50 µL of sterile saline. The microplates were coated

with Parafilm™ and incubated in the dark at room temperature in a close, seal plastic container containing a beaker of sterile deionized water. Two weeks later, cell respiration was measured by MTS/PMS staining, as described by Bélanger and collaborators (2011b). Briefly, 15 µL of MTS/PMS reagent were added in each well and followed by a 4 hours incubation at 30 °C in the dark. Each plate was scanned and centrifuged at 2634 x g for 5 minutes at 4 °C to pellet the cells. The supernatant from each well was transferred in a new clear bottom plates and readed at 490 nm on an OASYS UVM 340® microplate reader (Cambridge, UK). A verification of the membrane integrity was performed by epifluorescence microscopy with LIVE/DEAD® dye, as described above and the final pH was also measured in each well using the SN0274022P Accumet® microprobe and Fisher Scientific AB15 Accumet® pH meter (Fisher Scientific, Ottawa, Canada).

4.3.4. PLANTS

The alder toxicity test was conducted with two alder species, green alder (*Alnus viridis* spp. *crispa*, Quévillon, seedlot 84217.0) from Abitibi-Témiscamingue, and river alder (*A. incana* ssp. *rugosa*, Sylans Lake, seedlot 8421683) from Val d'Or, seeds were provided by the National Tree Seed Centre of Canada (Fredericton, NB). Seed stocks were stored at -20 °C in the dark until use. After hexane separation, seeds were sterilized with 30% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO) for 5 minutes (*A. crispa*) or 30 minutes (*A. rugosa*) with agitation (Bélanger et al., 2011a). After three rinses with sterile deionized water, the seeds were incubated in the dark for 24 hours at 4 °C for stratification. The sterilization steps were repeated and the sterilized seeds were placed on Petri dishes containing a basal germination medium (Bélanger et al., 2011b). The Petris were incubated under a regime of 16 hours of light (daytime brightness at 500-

600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) at 21 °C and 8 hours of darkness at 18 °C with a 70% humidity control for 4 to 5 weeks to permit germination (Bélanger et al., 2011b). Seedling transfer in sterile Magenta® (Shawnee Mission, KS) containing a mixture of sterilized sand : perlite (ratio 1 : 1) took place after 5 (*A. crispa*) and 4 weeks (*A. rugosa*) of incubation, when the seedlings were at a 1-3 leaf stage. The cultivation of alders was done in gnotobiotic condition with two seedlings per Magenta®. The Magentas® were placed in sterile polycarbonate containers (8 Magentas®/container) (Després Laporte, Sherbrooke, Canada) with two holes at each end covered with 0.22 μm MilliWrap membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA) for gas exchange, as described in Bélanger et al. (2011a). The plantlets were watered weekly with sterile Hoagland's 0.1X (Xiong et al., 2006) containing 5 ppm of nitrogen added in the form of KNO_3 and kept in the plantarium with the same conditions as for seed germination. After 6 weeks (4-6 leaves) in the greenhouse, inoculation took place on half of the seedlings. Two weeks old *Frankia* sp. ACN10a cultures were prepared as mentioned above. Half of the seedling receive 10 $\mu\text{L/PCV}$ (Pack Cell Volume) (Nittayajarn and Baker, 1989) of *Frankia* in 3 mL Hoagland's 0.1X + 5 ppm nitrogen solution. The watering and the conditions of the plantarium remained the same after inoculation. At 8 and 13 weeks post inoculation, all the alders (inoculated and non-inoculated) were exposed (except the control without AMD) to 5 mL of irradiated (unfiltered) AMD. The harvest was carried out in three separated times: 8 weeks post inoculation (before 8 weeks exposure), 13 weeks post inoculation (before 13 weeks exposure) and finally, 25 weeks post inoculation. 67 plants were harvested each time.

4.3.5. PLANTS HARVESTING AND DATA COLLECTION

Twenty-four hours before harvesting the plants, the chlorophyll content of the leaves was measured with the OPTI-SCIENCE CCM-300 fluorometer (OPTI-SCIENCES, NH, United-States) according to Gitelson, Gritz, & Merzlyak, 2003. The measurement was taken on three leaves per plants and a waiting time of 10 minutes was respected after bins opening. On harvesting day, all plants were taken out of the perlite / sand mixture and rinsed with deionized water to remove sand and perlite. The pH of the matrix (sand / perlite) for each Magenta® was taken. 10 g were air-dried and mixed with 10 ml of deionized water for 30 minutes, then the pH was read. (Wilke et al., 2005). Photos were taken and the height and diameter at the neck were measured for each of the plants. To prepare roots and nodules for ICP-MS analysis, they were successively dipped into three solutions of EDTA oxalate (18.61 g of EDTA, 13.4 g of Na-oxalate and 0.7455 g of KCl per liter of deionized water) and one last solution of deionized water. The number and appearance of nodules were then noted. Leaves, stems, nodules and roots were separated for oven drying for 72 hours at 70 °C or until no trace of moisture remains. The dry weights of each part were taken and used to calculate total biomass and the shoot-root dry weight ratio. The Seedling Volume Index (SVI) was calculated by multiplying the plant height by the squared-neck diameter. Nodule allocation was calculated by dividing nodular biomass by total biomass. The Specific Nodule Number (SNN) was calculated by dividing the root biomass by the number of nodules. The individual nodule weight was calculated by dividing the nodular total biomass by the number of nodules.

4.3.6. ICP-MS ANALYSIS OF METALS IN ALDER

Metal characterization of alders was carried out in two stages; the digestion of plant material and the ICP-MS analysis. Preliminary note: the water used in all of these procedures is obtained by triple treatment as described in Darnajoux (2015). Plant biomass was reduced to a fine powder using liquid nitrogen with a pestle and mortar. 25 mg of crushed sample was weighed and the digestion was done as described above for AMD. For samples containing a lot of labile organic materials, an additional 30 minutes at 65 °C was set up. Three blanks without a sample were made to evaluate the background of the ICP-MS and the cleanliness of the tubes. When the samples were completely digested, the volume was supplemented with Milli-Q water to obtain a total of 10 mL in each tube (final concentration of 20% HNO₃) and the tubes were vortexed. The ICP-MS analysis was done less than a week after digestion to ensure good sample retention. The digested samples were diluted by a factor of 10 (final 2% HNO₃ concentration) with Milli-Q water. Rhodium was used as an internal standard (12 ppb Rh) and the accuracy of measurements was tested using CRM SLRS5 (NRCC) as described in Darnajoux et al. (2015). ICP-MS analysis of boron (B), magnesium (Mg), aluminum (Al), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), scandium (Sc), titanium (Ti), vanadium (V), chromium (Cr), iron (Fe), manganese (Mn), cobalt (Co), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), arsenic (As), selenium (Se), molybdenum (Mo), sodium (Na), silver (Ag), cadmium (Cd), antimony (Sb), barium (Ba), tungsten (W), tellurium (Te) and lead (Pb) was done. Metal contents in plants are reported in µg of metal per g of dry weight (ppm).

4.3.7. STATISTICAL ANALYSIS

The metals shown in graphs were subjected to a Principal Component Analysis (PCA). This allowed to determine what were the main factors explaining inter-sample variation and which metals were related to the different conditions. Significant differences between the ellipses were obtained using a multiple variance test (MANOVA). All morphological and metal results were collated into graphs and subjected to statistical analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison test using GraphPad Prism 6.00 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). The morphological results (SVI and the shoot-root dry weight ratio) were statistically analyzed by two way anova with Sidacks post test. Regarding the number of nodules and the nodular biomass, these were statistically analyzed using one way ANOVA test with Tukeys post test. For statistical analysis of metals, we first made two-way test with Sidacks post test but because of interferences between the conditions, a decomposed analysis was carried out.

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1. IRRADIATED NATIVE AMD METAL CONTENT

In order to understand what were the effect of the AMD on plants and *Frankia*, ICP-MS analysis were performed on AMD. That analysis showed the elemental composition of

AMD as illustrated in table B1. Results also showed that Filtering or irradiating AMD did not reduce metal concentrations compared to native AMD (results not shown).

Table B1: Metal concentration in ppm (mg/kg) of metals for irradiated native AMD obtained by ICP-MS analysis.

Metal	Concentration	Metal	Concentration
Na	55.32	Ni	0.5362
Mg	188.5	Cu	1.859
Al	138.8	Zn	0.6754
P	3.216	As	0.03193
K	11.58	Se	0.1415
Ca	458.7	Mo	0.07446
Ti	1.146	Ag	0.01345
V	0.2146	Cd	0.004484
Cr	0.2981	Sb	0.0007472
Mn	19.68	Ba	0.1146
Fe	2942	W	0.01312
Co	0.7126	Tl	0.00008147
Pb	0.02348		

The results obtained showed that AMD did not exceed the acceptable levels of metals allowed by regulatory agencies for industrial land use in Canada (Norm C) (Beaulieu, 2016). These concentrations did however exceed allowed levels for final effluent of Directive 019 in regards to copper and iron (0.6 ppm and 6.0 ppm respectively) (MDDEP, 2012). The Doyon mine AMD was mostly comprised of Fe (39%), Ca (33%), Mg (14%), Al (9%), Na (4%) and Mn (1%). These percentages represent the concentration obtained for the metal on the total concentration of metals analysed. It is notable that Fe is a major constituent, which as expected, accounts for the orange colour of AMD. These proportions were similar for both solid and liquid phases (results not shown). Although metal composition is easy to determine, it is more difficult to understand their overall availability to living organisms. This is due to the fact that metals can be present in the environment under different forms which vary in regards to their bio availability.

4.4.2. TOLERANCE OF *FRANKIA* ACN10A TO AMD

Now that the elemental composition of AMD is known, it is possible to perform cell respiration of essay on *Frankia* sp. ACN10a and try to understand which element are causing the toxicity. *Frankia* sp. ACN10a is the strain used to inoculate plants in this study. Those results will be useful in order to understand the tolerance of the strain to AMD. Microplate assays revealed that AMD unadjusted pH was more toxic to *Frankia* than pH adjusted AMD. Cellular respiration was relatively well maintained up to the level of 50% AMD (pH adjusted) compared to 20% when AMD pH was unadjusted (figure B1).

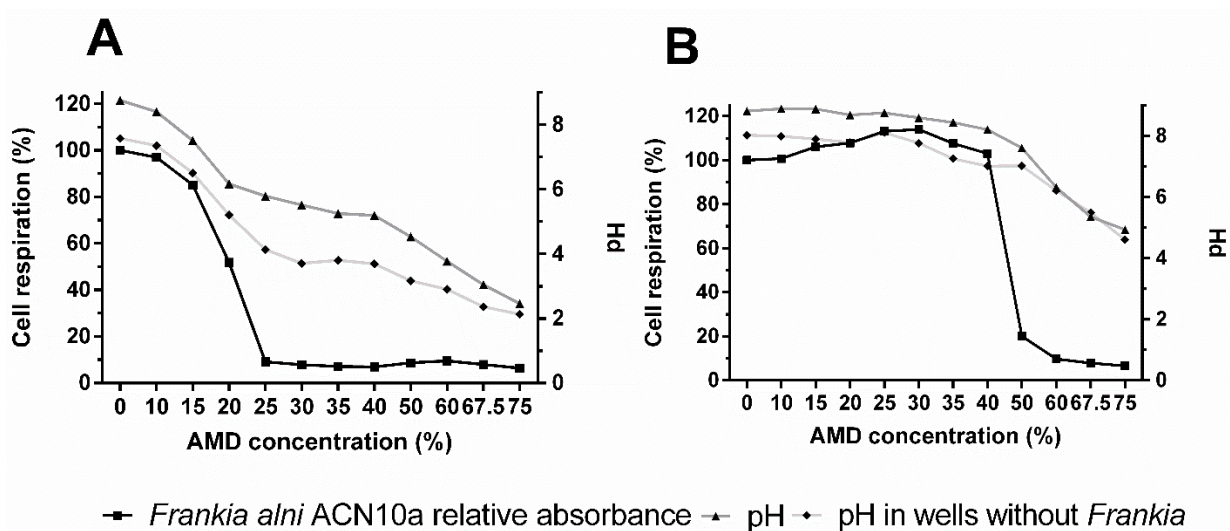


Figure B1: Cell respiration of *Frankia* sp. ACN10a after a two weeks exposition to AMD with unadjusted (A) or adjusted (B) pH (6.7). The relative absorbance represents the optical density obtained during reduction test of the MTS/PMS reported on 100% (maximal OD obtained with 0% of AMD equivalent to 100%). The pH (right axis) was measured in each well after the two weeks incubation.

For both types of AMD the reduction in cellular respiration was drastic once apparent toxic level was reached. It is nevertheless interesting to note that when exposed to pH adjusted AMD, *Frankia* appeared to have a stimulated respiration level when AMD exposure levels were between 10 and 40%. It is possible that metals such as Mn, Fe, B, Mg, Cu, Mo, Ni, and Co, had a stimulatory effect in regards to *Frankia* proliferation, as it has already been observed (Bélanger, 2010; Bélanger et al., 2011a; Igual and Dawson, 1999). These metals could stimulate *Frankia* growth when they are in low concentrations and at pH 6.7, as these would also be less bioavailable compared to conditions of low pH. From our own experience, *Frankia* strain ACN10a can increase

the pH of BAPS culture medium (unpublished observations). This phenomenon may have contributed to the observations made when *Frankia* was exposed to AMD at pH 2.9. Indeed, the final pH of these wells appeared to diminish more rapidly than cellular respiration, suggesting that the reduced metabolic activity of *Frankia*, therefore its reduced capability to alkalinize its medium, may have compounded the deleterious effect of the AMD.

Since viability was low above 25% AMD unadjusted pH, it was expected that final pH in these wells would also fall rapidly. This drop in pH was more pronounced between 10% and 25%, coinciding with the drop in viability. Final pH observed at 75% AMD exposure was approximately 2, indicating that *Frankia* development was likely arrested, as this pH was almost the same as in non-inoculated control wells. When *Frankia* was exposed to AMD with pH adjusted at 6.7, the drop in viability and drop in pH were also rapid and correlated. However, pH in wells with less than 50% AMD were similar. Membrane integrity, determined using the LIVE/DEAD® stain, corroborated these results (results not shown). Metal toxicity as a function of pH can stem from increased bioavailability. As an example, it is known that Ag, Zn, and Cu have antiseptic and antimicrobial properties even at very low concentrations (oligo dynamic action) (Tortora et al., 2003). However, a combined effect of pH and high concentration of metals may increase the degree of ionization of some elements as well as their capability to penetrate the bacterial cell (Black, 2008). In essence, the *Frankia* strain we studied was sensitive to AMD especially at pH 2.9. The increased viability of *Frankia* in the presence of AMD at pH 6.7, could be caused by the adaptation of *Frankia* to contaminants whereby resistance mechanisms would be induced (Pereira et al., 2006). Intracellular elemental homeostasis in prokaryotes can be maintained via numerous mechanisms that can act simultaneously, such as pumps limiting the entry of metals, efflux pumps and ligand proteins facilitating elemental transportation towards cellular targets (Summers, 2009). Some metals such as chromate and arsenate are capable of using

uptake mechanisms that are directed towards other compounds. In order to maintain homeostasis some bacteria can improve their resistance to metals by reducing the expression levels of the genes involved in the synthesis of transport systems , or replacing them with others allowing the reduction in the uptake of toxic elements (Ramírez-Díaz et al., 2008). Nitrogen fixing bacteria such as those from genus *Frankia* also possess siderophores to facilitate iron acquisition (Aronson and Boyer, 1994; Boyer et al., 1999). Siderophores can also exclude toxic metals from entering bacteria which could explain their tolerance to high levels of iron (Kraepiel et al., 2009).

4.4.3. GROWTH AND NODULATION OF ALDERS EXPOSED TO AMD

In our study, in order to understand a little more the effect of AMD on green and river alder, it was important to take a look at the effect of AMD on number of nodules and total weight of the nodules (figure B2). Those two are correlated with the symbiosis establishment. In river alder (figure B2A and B2B), the number of nodules per plant is reduced in the presence of AMD, suggesting deleterious effect of this extract. Results also show that this toxicity is lessened in the presence of alders having a more established symbiosis (13 weeks post inoculation), revealed by a less pronounced reduction in the number of nodules. The average total weight of nodules per plant remained similar in these conditions (see figure B2B), although the number of nodules was reduced. This reveals that although AMD was toxic to river alder, the host plant compensated nodule tissue development towards the lesser number of infection sites. This produced a lesser number of nodules, but nodules were larger. This is an interesting observation considering that larger nodules are known to fix a greater quantity of nitrogen (Huss-Danell, 1997).

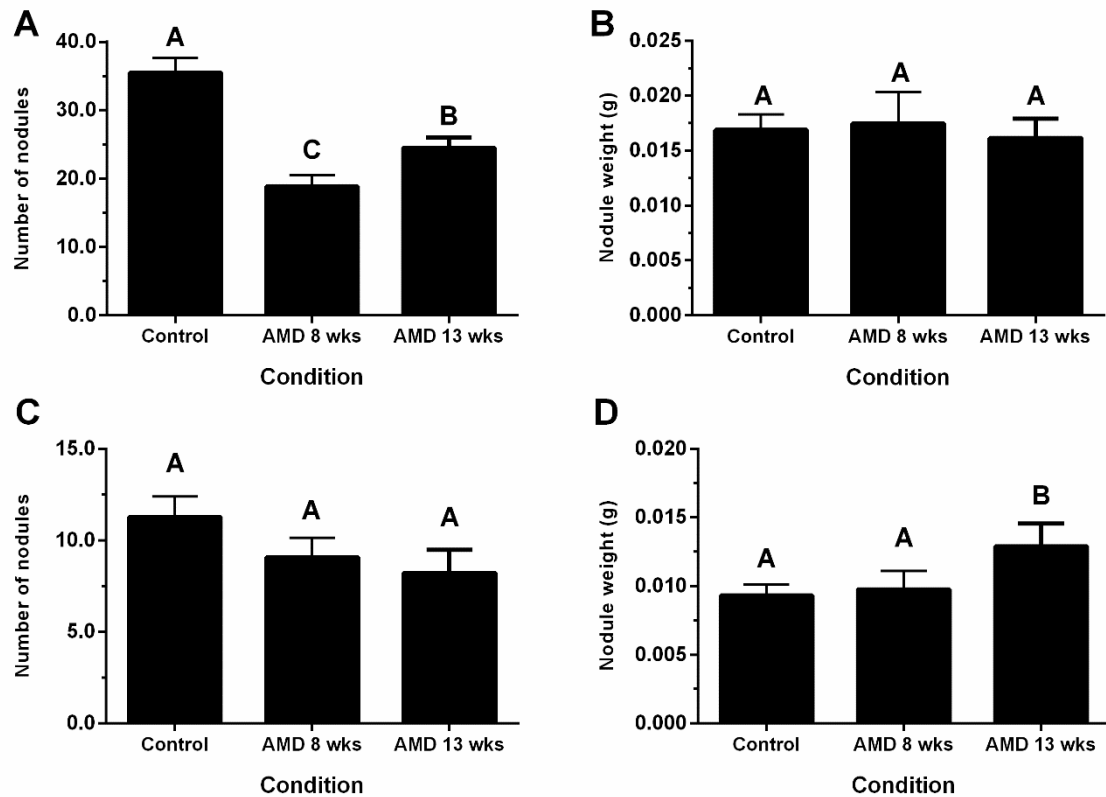


Figure B2. Number of nodules for river alder (A) and green alder (C) and total weight of the nodules for river alder (B) and green alder (D). All plants are 25 weeks old. The uppercase letters represent significant differences obtained between different inoculated plants.

River alder seems to invest more in nodules already present than in the recruitment of new sites of infection. The reduction in the number of nodules formed by river alder is likely due to the direct AMD toxicity on *Frankia* present in the rhizosphere. This hypothesis is supported by microplate assays that show *Frankia* sensibility to AMD. Such toxicity could reduce the infectivity of the inoculum. In addition, the presence of

AMD could also have negatively affected pre-nodule development, structures that are known to have an underdeveloped membrane and to be more sensitive (Huss-Danell, 1997). It must also be added that symbiosis establishment requires much resources from host plants and therefore plant investment in tolerating heavy metal stress could have reduced available resources to sustain nodule development (Barrette, 2017; Bélanger, 2010). In addition, although the actinorhizal symbiosis in alder is known to provide 70% to 90% of the nitrogen required by the host plant, the host plant still must provide sufficient photosynthates to allow nodule development (Nickel et al., 2001). It is also known that the energy requirements for nitrogen fixation are high and that host plants regulate the extent of infection sites development into nodules (Franche et al., 2009; Gualtieri and Bisseling, 2000; Mastrorunzio et al., 2008). Nevertheless, symbiosis remains a decisive advantage allowing alders to thrive in nitrogen limited environments where nitrates and ammonium are less available (Lundquist, 2005). Our results revealed that in the case of green alder (figure B2C and B2D), the number of nodules formed remains constant regardless of AMD treatment. However, AMD does have some effect, as we observe that total nodule weight is greater when AMD was added to the 13 weeks post inoculation plants compared to eight weeks post inoculation plants. Thus, the green alder does not see its number of nodules decrease with exposure to AMD but the size of these increases (only at 13 weeks). It is possible that the green alder reaches its maximum number of nodules at the beginning of its growth. In this case, it would be normal to see no increase in the number of nodules between 8 and 13 weeks. The effect of AMD here, however, would be present because as for river alder, an increase in the weight of the nodules is observed (only at 13 weeks for the green alder). However, if we compare these results with those obtained for the shoot-root dry weight ratio (figure B3A and B3B) (again with the addition of AMD at 13 weeks), we can see that the efficiency of the symbiosis was diminished since the shoot-root dry weight ratio show symbiosis efficiency.

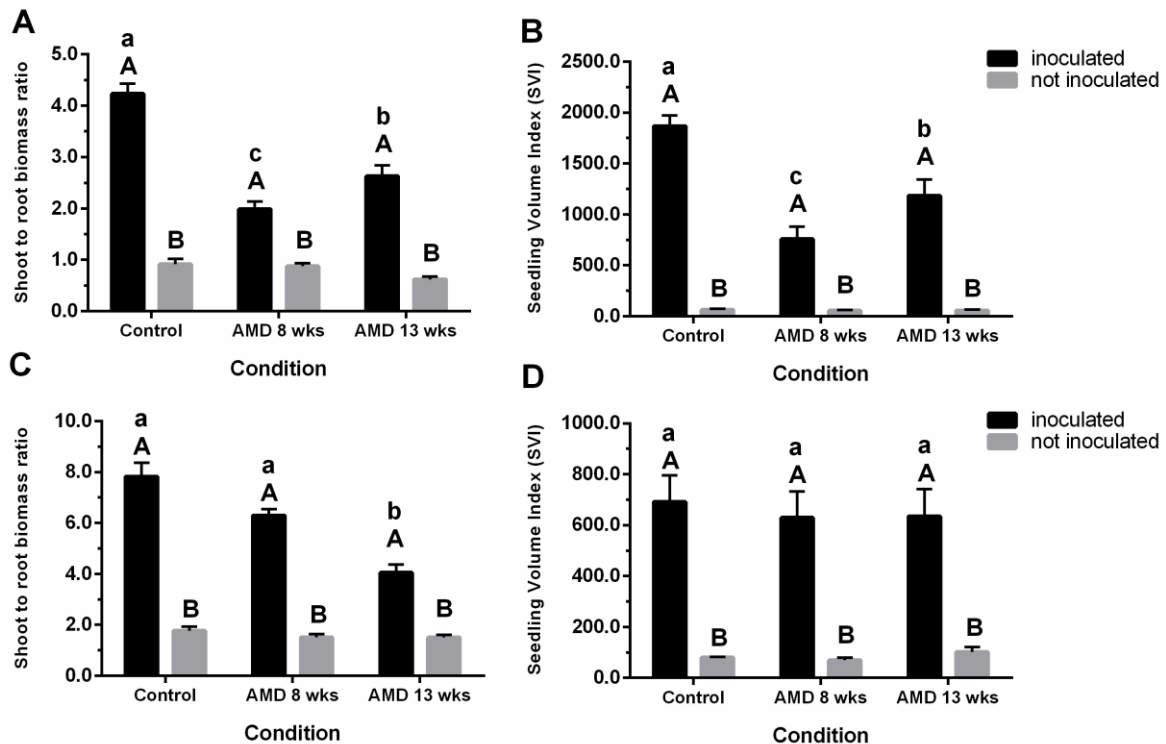


Figure B3. Shoot-root dry weight ratio for river alder (A) and green alder (C). Seedling volume index (SVI) for river alder (B) and green alder (D). The uppercase letters represent significant differences obtained between inoculated and non-inoculated plants and the lowercase letters represent significant differences obtained between different inoculated plants.

It may be that this reduction has caused the increase in the number of nodules. AMD appears to have a toxic effect on soil *Frankia* and/or nodules in the early stages of formation. The shoot-root dry weight ratio in river alder reveals that AMD negatively affected plants that were exposed to this stress eight weeks post inoculation. This toxic effect is supported by a lesser number of nodules that were formed. There appears to

be no significant effect of AMD on non-inoculated plants. This could be expected, since it appears AMD will mostly affect *Frankia* and/or symbiosis establishment through infection sites. In green alder, AMD toxicity appears to be revealed only in plants exposed to AMD 13 weeks post inoculation. In the case of green alder (figure B2C and B2D), contrary to river alder, the number of nodules does not appear to be directly correlated with symbiosis efficiency (figure B3C and B3D), since the number of nodules was similar in plants exposed to the three treatments and the shoot-root dry weight ratio was different. We also observed that green alder nodule size was not linked to symbiotic efficiency, since we observed a greater total nodule weight in plants exposed to AMD 13 weeks post inoculation, and that it is in this condition that there appears to be reduced efficiency. It is possible that fully formed nodules (plants exposed 13 weeks post inoculation) were more sensitive to AMD exposure. In regards to SVI in river alder, apparent AMD toxicity was revealed only in inoculated plants. This negative effect on plant development appeared lessened when plants were exposed 13 weeks post inoculation. Again, since this negative effect was only observed in inoculated plants, it is likely that AMD mostly affected *Frankia* and/or its capability to establish symbiosis in alder.

Our results show that although inoculated river alder appeared more affected by AMD, river alder nevertheless develop the most biomass and number of nodules. Total biomass production (SVI) is an important parameter to take into account for reclamation purposes since leaf fall will be the major mechanism through which alder will improve the nutrient status of these environments (Bélanger et al., 2015; Clemens, 2001; Rajkumar et al., 2012). In addition we see great improvement of total biomass in river alder when the symbiosis is better established (exposure 13 weeks post inoculation) and contrary to what was observed in green alder, symbiosis efficiency does not appear to be affected. Heavy metals are known to have deleterious effects on plants and bacteria. When present and available in toxic concentrations, they can inhibit their

growth. In plants, such effects can also be revealed by the presence of foliar chlorosis, necrotic lesions, progressive yellowing, curving or drying of leaves. Most studies agree in that the morphological consequences observed result from oxidative stress due to the presence of reactive oxygen species (ROS), although the molecular basis for such perturbations are not well understood (Cheng, 2003; Dietz et al., 1999; Prasad and Hagemeyer, 1999). It is possible this is what happened in inoculated river alder where morphometric characteristics such as height and SVI were reduced in the presence of AMD.

4.4.4. METAL COMPOSITION OF LEAVES

For brevity, only elemental composition of green alder will be presented here. PCA analysis of green alder elemental foliar composition shows that two main axes could explain the variance observed in results (figure B4). The horizontal axis shows 37.93% of variance due to plant size. Therefore, as plants were larger (height, total biomass, SVI), these plants had higher levels of Al, Ni, Se, Fe, and Cr in their leaves. These also had lesser levels of Mo and B. The vertical axis shows that 14.39% of variance was due to the presence of certain metals. For example, leaves containing more Se, Mn, Cd and Na tended to accumulate less Ti, Mg, Ba, and K. The horizontal elliptical grouping of AMD exposed plants demonstrates that their elemental distribution patterns were mostly explained by plant size. As this grouping was higher on the Y axis, AMD exposed plants will frequently have more foliar Na, Mn, Se, Cd and Co whereas non-exposed plants will tend to have higher concentrations of K, Ba, Mg, P, and Cu in their leaves.

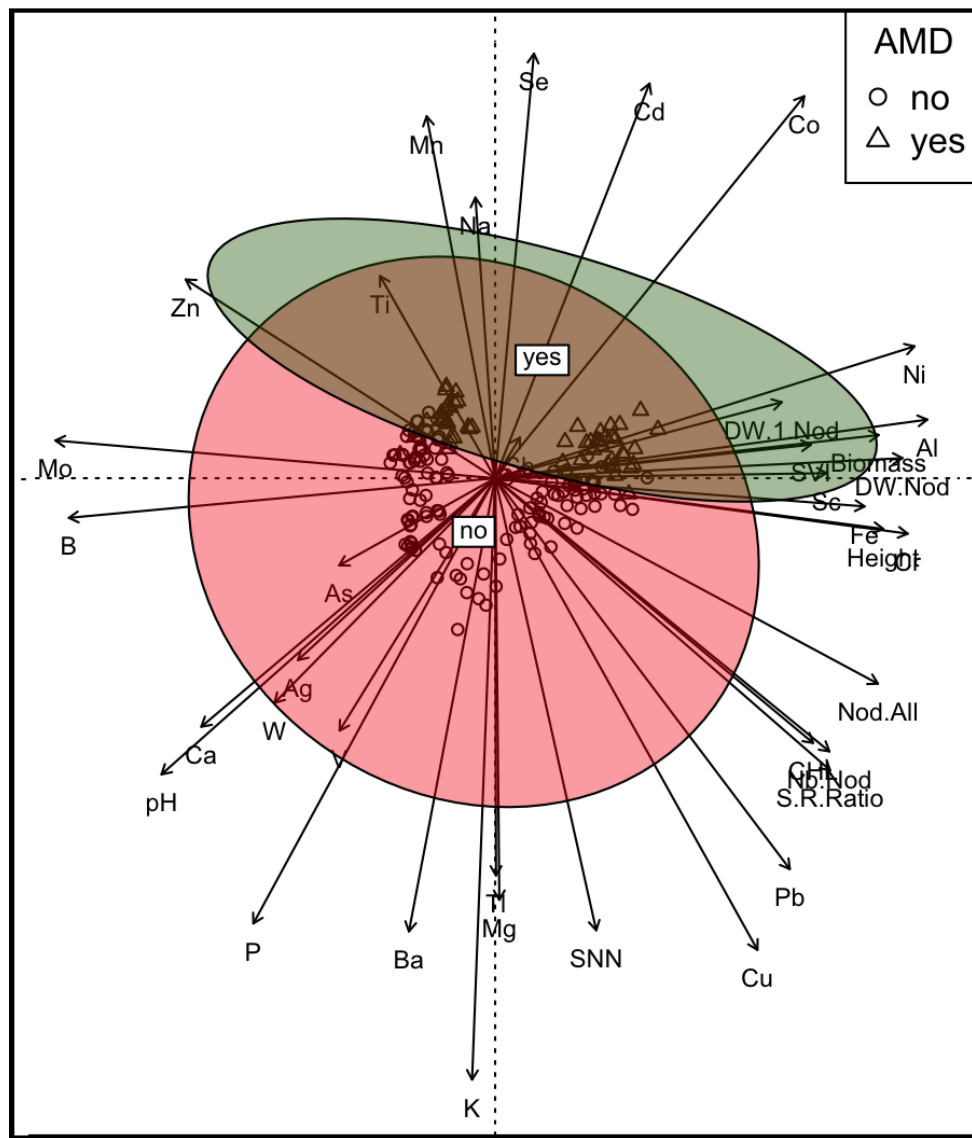


Figure B4. Results of the principal component analysis (PCA) conducted on green alder leaves. The green ellipse represents a conglomeration of plants who were exposed to the AMD and the red ellipse those who had not been exposed. Made from R software v2.15.2 with RStudio, Composition, FactomineR, Stats and Nortest pack (R development core team; <http://www.cran.r-project.org>).

Metals whose accumulation patterns were revealed to be interesting following PCA analysis were subjected to further examination. As reported in figure B5, decomposed two-way ANOVA statistical analysis was performed to determine significant differences in accumulation patterns.

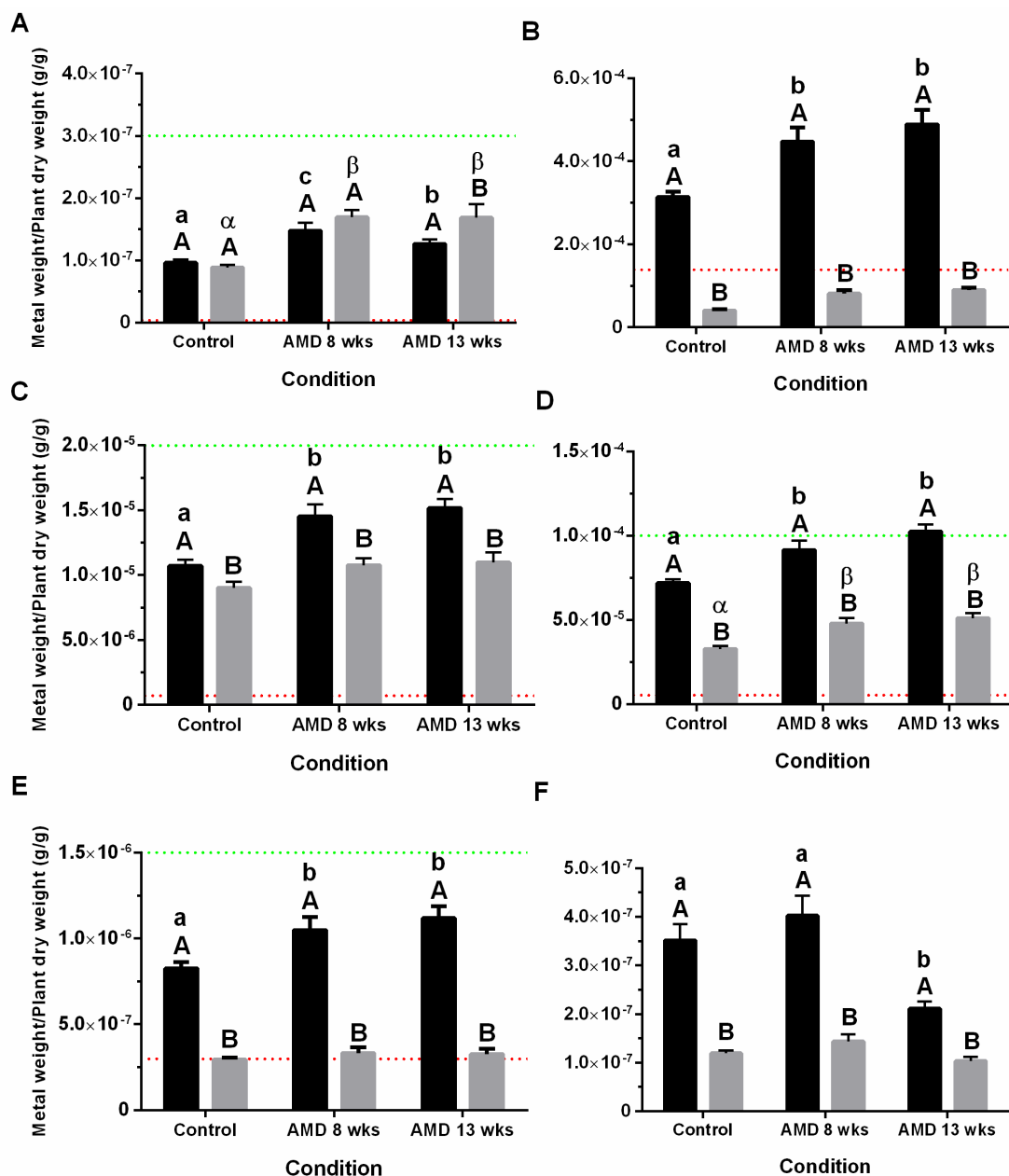


Figure B5. Concentration of the inoculated (black bars) and non-inoculated (gray bars) green alder leaves in Cd (A), Al (B), Co (C), Ni (D), Cr (E) and Pb (F). Concentration expressed in g/g (mass of the metal/mass of leaves). Different uppercase letters represent significant differences obtained between the

inoculated and non-inoculated plants for the same condition. The different lowercase letters represent significant differences between inoculated plants for the three conditions. The different Greek letters represent significant differences between non-inoculated plants for the three conditions. If present, dotted lines represent the metal concentration contained in AMD (red line) and the general toxicity threshold for plants (green line) according to Kabata-Pendias, 2001.

A first observation that can be made regarding 25 week old green alder (AMD 13 wks) is that they present no significant danger of heavy metal translocation for Fe, Mo, As, Zn, Pb, Mn, Ba, B, Ca, P, Ti and Ag (figure B5 and results not shown) when exposed to AMD. A moderate accumulation was observed for Sb and Cu, however only in the case of non-inoculated plants (results not shown). A moderate accumulation of Mg was also observed in both inoculated and non-inoculated plants (results not shown). The accumulation of Cd in inoculated green alder was higher when these had been exposed to AMD only eight weeks post inoculation compared to 13 weeks post inoculation. These results suggest that a less mature symbiotic alder is associated with a lesser capability to control Cd translocation to leaves. Cd can enter plants via nonspecific mechanisms such as Ca channels, which can compete with Ca uptake (Greger, 1999; Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). Indeed, 70% of Cd enter roots via this mechanism (Greger, 1999). In a previous study we have shown that Cd can have a negative impact on the establishment of symbiosis between *Frankia alni* ACN14a and European alder (*A. glutinosa* L. Gaertn) (Bélanger, 2010). Non-inoculated green alder accumulated higher concentrations of Cd. Since Cd has no known physiological function in higher plants (Clemens, 2001), and is known to be translocate freely in plants (Alloway, 1995; Greger, 1999), it is interesting to note that the presence of symbiosis reduces the level of Cd accumulation in alder leaves. Al, Co and Ni levels were higher in leaves of inoculated alders regardless of the moment at which these were exposed to AMD

compared to non-inoculated alders. This could be explained by the role of these elements play in the actinorhizal symbiosis.

Indeed, Co (figure B5C) is known to be an essential element for *Frankia* as it is involved in the synthesis of a vitamin B12 analog required in nitrogenase-catalyzed nitrogen fixation. Co is therefore not only an essential metal for the host plant but is also indirectly linked to improved nitrogen fixation (Huss-Danell, 1997). Co is not known to play a role in the establishment of symbiosis (Bélanger, 2010; Bélanger et al., 2015), but is recognized as an essential element in plants associated with nitrogen fixing bacteria (Gupta et al., 2002; Kabata-Pendias, 2011; Pawlowski and Bisseling, 1996). It is likely that the availability of this element is tightly regulated by green alder at the nodular level as is known to occur in European alder via metallothioneins (Gupta et al., 2002). Ni is known to be acquired passively in plants (Kabata-Pendias, 2011) and was accumulated in our study in both inoculated and non-inoculated plants. Although this has not yet been reported for green alder, in European alder Ni had a positive effect on the number of nodules developed following the inoculation of alder with *Frankia alni* ACN14a (Bélanger, 2010; Bélanger et al., 2015).

The increased levels of Al (figure B5B) in the leaves of green alder that had been inoculated is difficult to interpret, since although Al could have growth promoting properties for plants, the physiological role of this element is not fully understood (Clark, 1977; Foy et al., 1978; Kabata-Pendias, 2011). Some studies report that Al could be absorbed quickly in acidic soil and then cause chemical stress (Foy, 1984; Kabata-Pendias, 2011). In particular sulfur rich soils can produce $\text{Al}(\text{OH})\text{SO}_4$, which is highly soluble as well as H_2SO_4 (Kabata-Pendias, 2011). In some plant species such as wheat the contact of root hairs with Al can lead to the excretion of phosphate compounds that

increase rhizosphere pH and lead to the reduction of Al to the Al^{3+} form rendering this element less bioavailable (Kabata-Pendias, 2011; Ślaski, 1994). In the present study, Doyon mine AMD Al content was relatively high (138.8 ppm), likely due to the solubilization of this element under acidic conditions. Inoculated plants accumulated higher concentrations of Al in foliar tissue, which could be an indication of a mechanism to reduce excess Al concentrations in other plant tissues (Hall, 2002). Indeed, previous studies have reported the negative impact of Al on the symbiotic establishment in European alder (Bélanger, 2010; Bélanger et al., 2015) but in other studies, Al is believed to promote *Frankia* growth. One study performed on seven *Frankia* strains demonstrated that Al could even reverse negatives effects cost by low pH (Igual and Dawson, 1999). Cr was also accumulated in inoculated plants, however at a level well below concentrations known to be toxic to plants (Kabata-Pendias, 2011) and below the acceptable level of 0.0008 g/g specified for industrial use lands (Norm C) (Beaulieu, 2016). Cr is recognized as a toxic metal for living organisms. In addition there are no known studies regarding Cr toxicity towards the actinorhizal symbiosis. It is however known that this element can enter plant roots using the same mechanisms as Cd, a channel involved in the transportation of essential cations (Kabata-Pendias, 2011). Pb did not accumulate to notable levels in plants exposed to AMD, however when these plants were exposed 13 weeks post inoculation, Pb levels were lower than those observed in control plants suggesting that a better established symbiosis could allow plants to mitigate the uptake of this metal (Hall, 2002).

Deciphering the end result of the interplay between elemental acquisition, translocation, and accumulation mechanisms in different plant tissues is complex. The acquisition through active transport mechanisms of elements such as Cu, Mo and Zn could explain why these did not accumulate to a significant level in leaf tissues following AMD exposure. Other essential elements for plants (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) can become toxic when present in excessive concentrations. Intracellular ligands such as

phytochelatins could then be involved in the distribution patterns observed, as suggested by others for Cd, Cu, and Zn (Dazy, 2008). More specifically for alder, metallothioneins capable of linking with numerous metals (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+}) are known to exist in European alder (Gupta et al., 2002). The mobility of metals in soil also contributes to the patterns observed such as is the case for Cu known to be much less mobile in the presence of some chemical species of phosphorus and nitrogen (Kabata-Pendias, 2011). Elemental mobility can also be influenced by the presence of other metals. This is the case for Cu which is easily absorbed on Fe and Mn oxides or in the presence of excessive concentrations of Zn, Fe, Mo, Se, Ca, Al or Cr (Kabata-Pendias, 2011).

4.4.4. METAL COMPOSITION OF NODULES

Firstly, no accumulation was observed in green alder nodules in regards to Cu, As, Mo, P, Ca, Mn, Ba, B and Ti (results not shown). Cd, Al and Fe were however accumulated in the nodules of these plants (figure B6A, B6B and B6C). The increase in accumulation of these metals did not seem to be related to the lapse of time between inoculation and exposure to AMD.

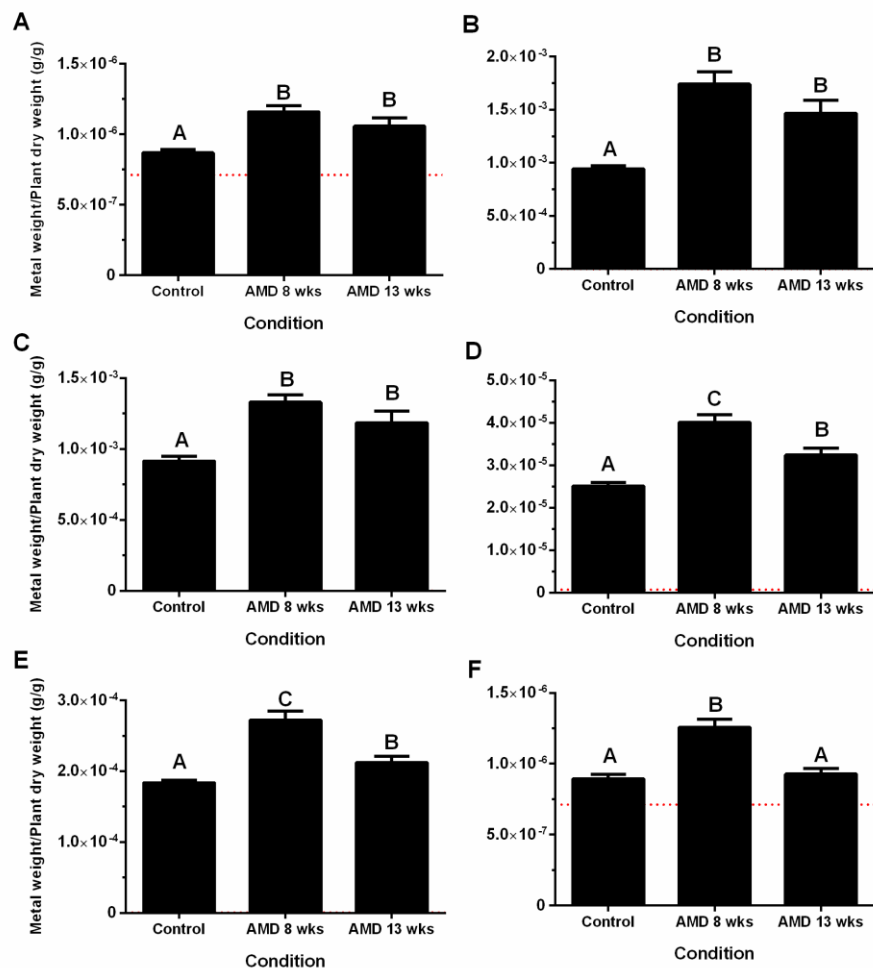


Figure B6. Cd (A), Al (B), Fe (C), Co (D), Ni (E) and Pb (F) concentration of inoculated green alder's nodules. The uppercase letters represent significant differences obtained between the conditions. If present, dotted lines represent the metal concentration of AMD (red line) and the general toxicity threshold of plants (green line) according to Kabata-Pendias 2001.

In these plants, these three metals were found in higher concentrations in nodules compared to leaves. Nodular tissues seem to absorb some metals, reducing their translocation to leaves. Cd concentrations were higher in leaves of alders that had not been inoculated, compared to those of inoculated alders (exposed 13 weeks post inoculation), an indication that plant biochemistry in the presence of symbiosis is greatly changed. There appears to be an increase acquisition of Al, which could be related to the known stimulatory effect of Al on *Frankia*. Regarding Fe, no accumulation was observed at the leaf level when adding AMD but was seen in nodules. The symbiosis and the nodules themselves would seem to play a determining role in the homeostasis of the plant, because it should be remembered that Fe was the metal found in a larger quantity in the AMD.

In regards to Co and Ni, we also observed higher concentration in nodule tissue compared to leaves (figure B6D and B6E). AMD exposure to inoculated alders produced higher levels of these two metals in nodule tissue. Inoculated alders had higher concentrations of these metals in their leaves compared to non-inoculated plants. The accumulation of Co and Ni in nodule tissues increased when the AMD exposure was performed sooner following inoculation (eight weeks post inoculation). The lapse of time between inoculation and exposure appeared to have no impact on the difference in concentrations of these metals found in leaves of inoculated alders. This could be due to the fact that the exposure was longer in this group of plants, since all plants were harvested at 25 weeks. It is however interesting to note that the foliar concentrations of these two metals were not significantly different when comparing plants exposed eight weeks post inoculation versus 13 weeks post inoculation. It could be inferred that nodular tissues absorb Co and Ni reducing their translocation to leaves, and both are known to stimulate *Frankia* growth (Huss-Danell, 1997; Wheeler et al., 2001). These metals were not accumulated in root tissues (aside from nodular tissue) and very low levels only were detected in stems (results not shown). A very similar

pattern was observed for Pb (figure B6F) with lower concentrations being found in leaves compared to nodules. For Pb, the nodule trend is similar to Ni and Co. Also, the leaf concentration was smaller than in the nodules and remained stable even with AMD exposure (no accumulation), with the exception of the condition exposed to 13 weeks where there was a significant decrease in Pb concentration with addition of AMD. Here we also see that the symbiosis and nodules especially have a regulating effect on the translocation of metals towards the upper parts of the plant. Since Pb is a toxic metal, it is possible that the presence of AMD induced resistance mechanisms since we observed a pronounced reduction in Pb foliar concentration in its presence.

4.5. CONCLUSION

Our results show that young alder seedlings can survive and develop in inorganic soil following sudden exposure to AMD. The symbiotic status of alder has a profound effect on micronutrient acquisition, accumulation and distribution in alders. It was found that Co, Ni and Al acquisition and accumulation were enhanced in the presence of symbiosis, while remaining at sub-toxic levels and also below concentrations stated in Norm C for industrial lands. The levels of the following elements also met this standard in regards to As, Cu, Pb, Zn, Cr, Cd, Ni, Ag, Ba, Mo, Co, Mn and Se. Considering that alder leaf fall will greatly contribute to the nutrient status of degraded lands, we also can conclude that leaf litter with these levels of metals and metalloids would constitute excellent organic amendments as these would meet norms set by the Bureau de Normalisation du Québec (BNQ, 2005) for grade A and AA composts.

The distribution and levels of Pb, Co and Ni found in nodular and leaf tissue in inoculated alders were quite interesting. The concentration of these three metals was higher in the nodules of plants when these had been exposed to AMD only eight weeks post inoculation compared to 13 weeks post inoculation. While we could infer that the duration of exposure to AMD in plants exposed eight weeks post inoculation could explain this phenomenon, both groups of plants had similar concentrations of the three metals in their leaf tissues. This suggests that an active mechanism could segregate these metals in nodular tissue. To further investigate this question, it would be necessary to compare plants with and without symbiosis present, plants of the same age, and determine if plants size had an influence on the endpoint concentrations we measured.

This study was intended to evaluate for the first time how the degree of development of the actinorhizal symbiosis in alder could influence the subsequent morphometry of the host plants as well as their capability to maintain microelemental homeostasis, following sudden AMD exposure. We conclude that when the actinorhizal symbiosis is more developed, its presence will facilitate the maintenance of microelemental homeostasis in heavy metal exposed alder. In addition, the heavy metal concentrations found in leaves suggest that we could expect symbiotic alders to produce leaf litter with minimal risks to the environment in regards to heavy metal dispersal due to bioaccumulation and leaf fall. These findings warrant further investigation to measure actual microelemental concentrations in leaves that have fallen from alders growing on heavy metal impacted sites. Finally, we suggest that alders could be a relevant choice if constructing an environmental impact buffer zone (i.e. green belt) near industrial sites where acidogenic tailings are stored.

4.6. ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) through the Programme de recherche en partenariat sur le développement durable du secteur minier. We also acknowledge the contribution of Université Laval that provided access to the *Frankia* collection of Maurice Lalonde (*Frankia* sp. ACN10a) and would like to thank René Gagnon and Philippe Venne for technical support with ICP-MS. I would also like to thank Iamgold for their financial support without which I could not have completed this project. We would also like to thank Éric Belleau and Steve Lalancette from Régénération and Evgeniya Smirnova from Centre Technologique en Résidus Industriels (CTRI) for their contributions to the field experiments as well as Sylvain Lortie (Iamgold Corp.), Hassine Bourihane (CTRI) and Simon Thibault (Roche Consultants) for their support and counsel throughout the project. We thank Julie Beaudin for constructive criticism and assistance in preparing the manuscript.

5. REFERENCES

- Alloway, B.J., 1995. Soil processes and the behaviour of heavy metals, in: Alloway, B.J. (Eds.), Heavy metals in soils. Springer, Netherlands, pp. 11–35.
- Aronson, D.B., Boyer, G.L., 1994. Growth and siderophore formation in six iron-limited strains of *Frankia*. Soil Biol. Biochem. 26, 561–567.
- Barrette, K., 2017. Étude de la symbiose actinorhizienne chez l’aulne en présence de résidus miniers aurifères acidogènes. M. Sc. thesis, Sherbrooke University, Sherbrooke.
- Barrette, K., 2018. Impacts of heavy metals from gold mine tailing sands on the actinorhizal symbiosis in alders shrubs and risks of metal dispersion during leaf fall. In preparation for ecological engineering.
- Beaulieu, M., 2016. Guide d’intervention - protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés, ministère du développement durable, de l’environnement et de la lutte contre les changements climatiques.
- Bélanger, P.-A., 2010. Étude de l’effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. et sa symbiose avec l’aulne noir (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn). M. Sc. thesis, Sherbrooke University, Sherbrooke.
- Bélanger, P.-A., Beaudin, J., Roy, S., 2011a. High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. J. Microbiol. Methods. 85, 92–97.
- Bélanger, P.-A., Bissonnette, C., Bernèche D’Amours, A., Bellenger, J.-P., Roy, S., 2011b. Assessing the adaptability of the actinorhizal symbiosis in the face of environmental change. Environ. Exp. Bot. 74, 98–105.
- Bélanger, P.A., Bellenger, J.P., Roy, S., 2015. Heavy metal stress in alders: tolerance and vulnerability of the actinorhizal symbiosis. Chemosphere. 138, 300–308.

Black, J.G., 2008. Microbiology: principles and explorations. John Wiley & Sons, New York.

BNQ, 2005. Amendements organiques - composts - détermination de la teneur en corps étrangers - méthode granulométrique (CAN/BNQ 0413-210).

Boyer, G.L., Kane, S.A., J.A., A., Aronson, D.B., 1999. Siderophore formation in iron-limited cultures of *Frankia* sp. strain 52065 and *Frankia* sp. strain CeSI5. Can. J. Bot. 77, 1316–1320.

Cheng, S., 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. Environ. Sci. Pollut. Res. 10, 256–264.

Clark, R.B., 1977. Effect of aluminum on growth and mineral elements of al-tolerant and Al-intolerant corn. Plant Soil. 47, 653–662.

Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta. 212, 475–86.

Darnajoux, R., 2015. Étude de l'homéostasie des micronutriments de la fixation d'azote au sein de la symbiose lichénique en forêt boréale. Ph. D. thesis, Sherbrooke University, Sherbrooke.

Dazy, M., 2008. Caractérisation de la colonisation spontanée par les plantes de sols pollués. Rôle des systèmes cellulaires de détoxification. Ph. D. thesis, Metz University, Metz.

Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants, in: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.), Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 73–97.

Foy, C.D., 1984. Adaptation of plants to mineral stress in problem soils. Ciba Found. Symp. 102, 20–39.

Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plant. Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 11–66.

- Franche, C., Lindström, K., Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. 321, 35–59.
- Gitelson, A.A., Gritz, Y., Merzlyak, M.N., 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journ. of Plant Phys.*. 160, 271–282.
- Greger, M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants, in: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.), *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Springer, Berlin, pp. 1–27.
- Gualtieri, G., Bisseling, T., 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* 42, 181–194.
- Gupta, R.K., Dobritsa, S. V., Stiles, C.A., Essington, M.E., Liu, Z., Chen, C., Serpersu, E.H., Mullin, B.C., 2002. metallothioneins: a new class of plant metal-binding proteins. *J. Protein Chem.* 21, 529–536.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1–11.
- Huss-Danell, K., 1997. Tansley review No. 93 -actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytol.* 136, 375–405.
- Igual, J.M., Dawson, J.O., 1999. Stimulatory effects of aluminum on in vitro growth of *Frankia*. *Can. J. Bot. Rev. Can. Bot.* 77, 1321–1326.
- Kabata-Pendias, A., 2011. *Trace elements in soils and plants*, CRC, Pulawy, Poland.
- Kraepiel, A.M.L., Bellenger, J.P., Wichard, T., Morel, F.M.M., 2009. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals*. 22, 573–581.
- Lundquist, P.-O., 2005. Carbon cost of nitrogenase activity in *Frankia–Alnus incana* root nodules. *Plant Soil*. 273, 235–244.
- Mastrorunzio, J.E., Tisa, L.S., Normand, P., Benson, D.R., 2008. Comparative secretome analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in *Frankia* symbionts. *BMC Genomics*. 9, 47.

MDDEP, 2012. Directive 019 Sur l'industrie Minière.

Nickel, A., Pelz, O., Hahn, D., Saurer, M., Siegwolf, R., Zeyer, J., 2001. Effect of Inoculation and Leaf Litter Amendment on Establishment of nodule-forming *Frankia* populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2603–2609.

Nittayajarn, A., Baker, D.D., 1989. Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass. *Plant Soil* 118, 199–204.

Pawlowski, K., Bisseling, T., 1996. Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features?. *Plant Cell*. 8, 1899–1913.

Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., Figueira, E.M. de A.P., 2006. Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: effects on protein expression. *Appl. Soil Ecol.* 33, 286–293.

Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants, in: Hagemeyer, J. (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99–116.

Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1562–1574.

Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals*. 21, 321–332.

Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105–130.

Ślaski, J.J., 1994. Differences in the metabolic responses of root tips of wheat and rye to aluminium stress. *Plant Soil*. 167, 165–171.

Summers, A.O., 2009. Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 138–144.

- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2003. Introduction à la microbiologie. ERPI.
- Wheeler, C.T., Hughes, L.T., Oldroyd, J., Pulford, I.D., 2001. Effects of nickel on *Frankia* and its symbiosis with *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Plant Soil 231, 81–90.
- Wilke, B.M., Margesin, R., Schinner, F., 2005. Monitoring and assessing soil bioremediation, Soil Biology. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Xiong, Z.-T., Liu, C., Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 273–280.

CHAPITRE 4

TOLÉRANCE AU DMA DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE *FRANKIA*

1. MISE EN CONTEXTE DES TRAVAUX

La survie des plantes sur les sites miniers comme celui de la mine Doyon peut être précaire. Cela est aussi vrai pour les plantes pionnières comme l'aulne. Ce site minier en plus d'être susceptible aux problèmes de sécheresse et d'érosion éolienne a le désavantage d'être à fort potentiel acidogène (production de DMA). Les aulnes, même s'ils ont l'avantage d'être naturellement retrouvés en symbiose avec l'actinobactérie *Frankia* et donc d'avoir accès à de plus grande quantité d'azote, ont parfois besoin d'une préparation particulière avant d'être employés de réhabilitation minière. Même s'il est vrai que l'établissement d'aulne se produise de façon naturelle sur certains sites inactifs, il a été démontré que la préinoculation avait un effet bénéfique sur la survie et le développement des aulnes en milieux stressé. La présente étude a mise en lumière l'utilisation de *Frankia* sp. ACN10a comme acteur symbiotique. Ce chapitre viendra compléter ce qui a été démontré dans les chapitres précédents en venant évaluer la toxicité du DMA envers d'autres souches de *Frankia* pouvant être considérées ultérieurement pour la réhabilitation de site minier.

2. INTRODUCTION

On parle de tolérance lorsque les organismes tolèrent la présence des métaux grâce à leurs caractéristiques biologiques intrinsèques et de résistance lorsque les organismes survivent en présence de métaux à l'aide de mécanismes de détoxification spécifiques induits en présence du contaminant (Gadd, 1992). Il serait intéressant de comprendre et connaître les différents seuils de toxicité des bactéries envers les contaminants si l'on veut avoir des organismes résistants et spécifiques aux différents sites où l'on voudrait les implanter dans un but de revégétalisation. La bactérie en question ici est *Frankia*, une bactérie Gram à positif retrouvée majoritairement dans le sol (Normand et al., 1996, 2014). Il est connu que *Frankia* engendre la formation de nodules racinaires (Valdés-López et Hernández, 2008) caractéristiques d'une symbiose actinorhizienne réussie, mais elle peut aussi être sous forme libre dans un sol riche (forme saprophyte) et persister même en absence de plantes hôtes (Richardson et al., 2000). Il a été démontré dans cet ouvrage et dans Barrette (2017) que *Frankia* était plus apte à survivre à l'intérieur du nodule que sous sa forme saprophyte lorsque le milieu était contaminé. Le type de contamination présenté est une forte teneur en métaux lourds retrouvée sur un site dont les résidus ont un fort potentiel acidogène. La préinoculation est un avantage significatif pour l'établissement et le bon maintien de plantes sur les sites miniers (Barrette, 2017). Toutefois, même si l'inoculation de semis d'aulnes destinés à être employés sur des sites miniers se ferait à la pépinière de production et que la *Frankia* semble bien à l'abri dans les nodules, il ne faut pas oublier que celle-ci retournera éventuellement dans la nature sous forme libre par un mécanisme de sénescence nodulaire. C'est pour cela qu'il serait important de mieux connaître les différentes souches de *Frankia* et savoir lesquelles sont plus aptes à tolérer ou résister aux contaminants spécifiques du milieu où l'on veut les introduire. La *Frankia* sous forme saprophyte dans le sol aurait par la suite l'occasion

de réinfecter de nouvelles racines de façon autonome et sans nécessité d'actions humaines.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. ÉCHANTILLONNAGE, CONSERVATION ET ANALYSE ICP-MS DU DMA

Le DMA récolté sur le site minier à l'été 2014 a été entreposé à 4 °C à l'obscurité et a été stérilisé par irradiation avec des rayons gamma (50 kGy) chez Nordion (Laval, Canada). Ensuite, le DMA a été conservé à l'obscurité et à -80 °C. Lorsque nécessaire, la filtration du DMA a été effectuée à l'aide d'une pompe à vide raccordée à une membrane filtrante Whatman de 0.22 µm de type SteriTop. Pour vérifier si la filtration venait sous-estimer la concentration en métaux du DMA, celui-ci a aussi été centrifugé dans des DigiTube de 15 mL résistants à l'acide nitrique (SCP science, # 010-515-261) à l'aide de la centrifugeuse Sorval Legend RT (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) pour 10 minutes à 3440 x g. Pour déterminer la concentration en métaux du DMA à l'aide de l'appareil ICP-MS, 5 mL de DMA ont été évaporés et digérés dans des DigiTube de 15 mL résistants à l'acide nitrique (SCP science, # 010-515-261) dans l'appareil DigiPrep Jr SCP. La digestion a été faite en ajoutant 2 mL d'acide nitrique (HNO₃) *trace metal grade* de Fisher. Pour que la digestion soit la plus complète possible, l'acide a été ajouté en deux temps. 1 mL d'acide a été premièrement ajouté suivi d'un temps d'attente de 30 minutes à température pièce. Par la suite, la digestion comportait une première montée de la température jusqu'à un plateau à 45 °C et durant 30 minutes.

Après ce temps, un deuxième millilitre d'acide nitrique a été ajouté, avant une seconde montée de la température qui permettait d'atteindre un deuxième plateau à 65°C, d'une durée d'une à trois heures. Une fois terminé, le volume a été complété à 10 mL avec de l'eau MilliQ et la solution a été diluée 5 000, 10 000 et 100 000 fois et 200 µL d'acide nitrique *trace metal grade* qualité OPTIMA ont été ajoutés pour avoir une concentration finale en acide nitrique de 2% nécessaire à l'analyse ICP-MS.

3.2. SOUCHES BACTÉRIENNES

Les souches utilisées dans ces essais peuvent être divisées en deux catégories. La première correspond à deux souches qu'on pourrait qualifier de bien connues et qui sont déjà utilisées au laboratoire. La première souche de *Frankia* utilisée dans ces essais était *Frankia alni* ACN14a (ULQ010201401) isolée par Normand et Lalonde d'aulnes crispés de Tadoussac en 1982 (Normand et Lalonde, 1982). *Frankia alni* ACN14a a été gracieusement fournie par le Centre d'étude de la forêt, Université Laval, Québec, Canada. La deuxième est *Frankia* sp. Avcl1, isolée d'un nodule d'aulne crispé dans la région d'Atikokan, Ontario (Baker et al., 1980). La seconde catégorie regroupe les souches de *Frankia* isolées à partir d'échantillons de sol récoltés sur le site minier. Huit isolats ont été testés. Sur ceux-ci, quatre provenaient d'une zone fortement exposée au DMA et ont été surnommés F171, F172 et 173 (pour ces isolats, la souche *Frankia* ACN12a est la plus apparentée). Six autres provenaient de zones sans DMA et seront appelés F148, F150, F152 et F154 dans cet ouvrage (la souche de *Frankia* Cpl1 est la plus apparentée). Enfin, une dernière provenait d'une zone partiellement exposée et elle a été nommée F149 (la souche de *Frankia* Cpl1 est la plus apparentée). Les centrifugations d'un volume de 2 mL et moins ont été réalisées dans une micro centrifugeuse AccuSpin Micro 17R (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) tandis que celles

d'un volume supérieur à 2 mL ont été effectuées dans une centrifugeuse de table Sorval Legend RT (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Les souches ont été cultivées à 30°C et à l'obscurité en conditions statiques et en erlenmeyer de 1 L contenant 400 mL de milieu BAPS (Igual et Dawson, 1999) supplémenté avec 5 g/L de succinate de sodium à pH 6.7. Les cultures utilisées comme inoculum étaient âgées de deux semaines. Les cultures de *Frankia* en suspension ont été centrifugées (10 minutes, 3440 x g, 4°C), puis le culot a été lavé deux fois avec de la saline stérile avant d'être remis en suspension dans un volume minimal de saline (NaCl 0.85% p/v). Les hyphes étaient alors homogénéisés avec une seringue de 10 mL Luer-Lok™ Tip (BD, Franklin Lakes, NJ) et d'une aiguille de 18G 1¹/₂. L'intégrité membranaire ainsi que l'absence de contamination ont été observées une semaine avant chaque expérience par microscopie à épifluorescence, telle que décrit dans le protocole du manufacturier. Un ratio de colorant LIVE/DEAD® (L13152, Molecular Probes®, Ontario, Canada):culture de 1:1 a été utilisé pour l'observation microscopique. Le réactif a été préparé selon les recommandations du fabricant. L'observation a été réalisée à un grossissement de 1000x. La biomasse apparaissant verte a été dite viable alors que la rouge a été dite non viable. La capacité de la culture à réduire le MTS/PMS a aussi été mesurée la veille de l'expérience en prenant 1 mL de culture, mélangé à 75 µL du réactif MTS/PMS (1 g de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), CellTiter96® AQueous MTS Reagent Powder, G1111, Promega, USA) dans 500 mL de NaCl 0.85% supplémenté de 0.023 g de PMS (Phenazine Methosulfate, P9625, Sigma, Ontario, Canada), pH ajusté entre 6.0 et 6.5) et en l'incubant à 30°C pour 4 heures.

3.3. PRÉPARATION DU TEST DE TOLÉRANCE AU DMA

Les cultures de *Frankia* étaient lavées, homogénéisées, lysées au sonicateur (SONICS Vibra Cell TM, model : VCX 130PB) pour 30 secondes avec une amplitude de 40% puis dosées par photospectrométrie par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) dans l'optique d'obtenir une concentration protéique de 60 µg/mL. Cette méthode consistait à mélanger un volume de *Frankia* (entre 10 et 50 µL) avec la saline (800 µL – le volume de *Frankia*) et 200 µL de réactif de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, USA, Cat # 5000006) puis lire la densité optique au spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro, Biochrom, Cambridge, 80-2112-21) à 595 nm. Le BAPS était préparé à une concentration de 1.33X afin d'obtenir une concentration finale de 1X dans chacun des puits. Le DMA filtré à l'aide d'un SteriCup (Filtropur V50 0.2 µm, 500 mL Vacuum filter, SARSTEDT, 83.1923.001, USA) était supplémenté avec les constituants du BAPS. (1.33X) puis était mis dans les puits. 4 microplaques 96 puits étaient préparées pour chacune des souches en y ajoutant des concentrations de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 67.5 et 75% de DMA (dilutions faites dans les puits avec du BAPS 1.33X à pH 6.7). Deux microplaques étaient préparées avec du DMA 1.33X à pH non ajusté (pH aux alentours de 2.90) et deux avec du DMA 1.33X à pH ajustés à 6.7. Ensuite, 50 µL de culture bactérienne (concentration protéique de 60 µg/mL) étaient prélevés et mis dans les puits (concentration finale de 15 µg/mL). Les puits servant de témoins négatifs ont reçu 50 µL d'une solution saline (0.85%) stérile. Les microplaques étaient recouvertes avec du Parafilm TM et incubées à l'obscurité et à température pièce dans un bac de plastique fermé et scellé contenant un bēcher d'eau déionisée stérile. Après deux semaines, la respiration cellulaire, indice de la viabilité, de la prolifération cellulaire et d'un métabolisme actif, des cultures contenues dans les puits était révélée par coloration au MTS/PMS, tel que décrit par (Bēlanger et al., 2011). Ce sel de tétrazolium est réduit en formazan dans le processus de la chaîne de transport des électrons chez les cellules viables, donnant ainsi une couleur brunâtre.

Pour cette coloration, 15 μL de réactif MTS/PMS étaient ajoutés aux 200 μL total de culture contenus dans chacun des puits. Il s'en est suivi d'une incubation de 4 heures à 30°C dans l'obscurité. Des numérisations étaient prises pour chacune des plaques afin de consultation ultérieure. Les plaques ont ensuite été centrifugées à 3 500 rpm, 5 minutes à 4 °C afin de culotter les cellules. Le surnageant de chaque puits a ensuite été transféré dans de nouvelles plaques à fond clairs et lues à 490 nm sur un lecteur de microplaques UVM 340® de OASYS. La densité optique obtenue a ensuite été transformée en absorbance relative ou le 0% de DMA équivalait au 100%. Une vérification de l'intégrité membranaire a été réalisée par microscopie à épifluorescence avec colorant LIVE/DEAD®, tel que décrit plus haut. Le pH des puits a aussi été pris à l'aide d'une microsonde SN0274022P Accumet® et d'un pH-mètre AB15 Accumet® de Fisher Scientific.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de densité optique (qui illustre la respiration cellulaire) ont été mis en absorbance relative afin de pouvoir comparer les résultats obtenus pour le DMA à pH ajusté et non ajusté ainsi que la tolérance des différentes souches entre elles (figure 8). Pour les deux souches, les essais en microplaques ont montré que le DMA à pH non ajusté (environ 2.9) engendrait beaucoup plus de stress que celui ajusté à 6.7. C'est aussi ce qui avait été observé avec *Frankia* sp. ACN10a au chapitre 3. *Frankia* sp. Avcl1 et *Frankia alni* ACN14a étaient non viables et dépourvues de métabolisme actif à des concentrations respectives de 20% et 30% en DMA à pH non ajusté (figure 8A et 8C). Lorsqu'au-dessous d'une respiration relative de 20%, nous considérons que la souche était métaboliquement inactive. On atteint 50% et 60% lorsque le pH est ajusté à 6.7 (figure 8B et 8D). L'observation microscopique corrobore les résultats de viabilité. Pour la condition où le pH a été ajusté à 6.7 et celle où il n'a pas été ajusté, ce serait *Frankia alni* ACN14a qui serait la plus tolérante. Toutefois, une chute de l'absorbance relative est observée à 10 % avec le DMA à pH ajusté et non ajusté (figure 8C et 8D). Cette observation semble montrer qu'il y a une certaine adaptation de la souche en réponse à l'agent stressant. En effet, il semblerait qu'à des concentrations plus faibles de DMA (entre 10 et 20%), il y ait une diminution importante de l'absorbance relative qui pourrait pouvant être liée soit au pH ou à la présence de métaux lourds. La souche semble être apte à induire des mécanismes de défense lorsqu'elle est en contact avec des concentrations suffisantes de DMA, mais ne pas pouvoir le faire quand elles sont trop faibles.

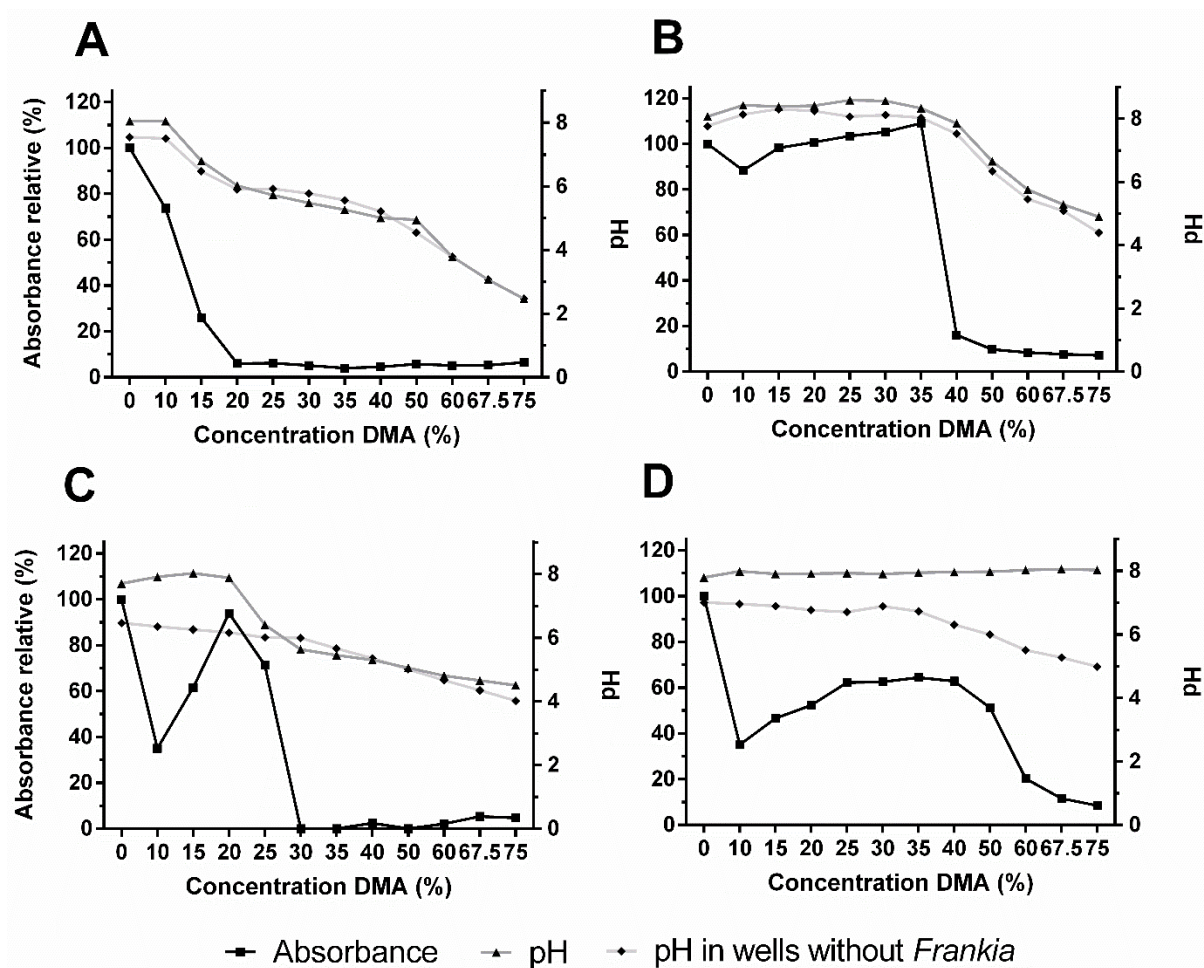


Figure 8. Résultats des tests de tolérance au DMA pour les souches *Frankia* sp. Avcl1 à pH non ajusté (A) et ajusté à 6.7 (B) et *Frankia alni* ACN14a à pH non ajusté (C) et ajusté à 6.7 (D). L'absorbance relative représente la densité optique obtenue lors du test de réduction du MTS/PMS rapporté sur 100% (le 0% DMA équivalent à 100%). Ce pourcentage représente la respiration cellulaire relative des souches. Le pH (axe de droite) a été mesuré dans chacun des puits après deux semaines d'incubation.

Comme la souche de *Frankia alni* ACN14a semble survivre en présence de métaux à l'aide de mécanismes de détoxification induits en présence du contaminant, elle pourrait réagir au contaminant selon le principe de résistance précédemment décrit. La souche *Frankia* sp. Avcl1 aussi pourrait être de ce type, car avec le DMA à pH non ajusté, on voyait aussi une légère diminution à 10%. Toutefois, elle semble aussi tolérer ce même DMA, car on voit une légère augmentation. Justement, il est intéressant de noter que pour *Frankia* sp. Avcl1 en DMA à pH ajusté, une légère augmentation est observée entre 10 et 40% de DMA (figure 8B). Cela avait aussi été observé au chapitre 3 avec *Frankia* sp. ACN10a. Il se pourrait que certains métaux comme L'Al soient impliqués (Igual et Dawson, 1999). Le Mg, Fe, B, Mn, Cu, Mo, Ni, et le Co pourraient aussi avoir un effet positif sur la prolifération de *Frankia*, car ceux-ci ont un effet positif sur la croissance de *Frankia* (Bélanger, 2010; Bélanger et al., 2011). Ces métaux pourraient stimuler la croissance de *Frankia* en faible concentration et à haut pH, car ils seraient moins biodisponibles et donc moins toxiques (sous le seuil de toxicité). Comme certaines souches de *Frankia* peuvent alcaliniser leur milieu (résultats non publiés), l'alcalinisation est donc associée à une culture active. Avec les microplaques à pH non ajusté, on voit que le pH diminue suivant la concentration de DMA qui augmente (par rapport au témoin sans *Frankia*), indiquant que la toxicité du DMA engendre une mortalité traduite par un arrêt de l'alcalinisation. En présence de DMA à pH non ajusté, la viabilité était nulle à 20 et 30% pour Avcl1 et ACN14a respectivement, il était donc attendu de voir décroître le pH plus rapidement. Justement, le pH diminue plus drastiquement entre 10 et 20% pour Avcl1 et entre 20 et 30% pour ACN14a respectivement, concordant avec la chute de viabilité. Le pH en fin d'incubation obtenu avec 75% de DMA (non ajusté) est aux alentours de 2 et de 4 (résultats semblables pour les blancs) pour Avcl1 et ACN14a, ce qui indique qu'à cette concentration, les *Frankia* étaient presque incapables de se développer. En ce qui concerne les pH de la microplaque de DMA à pH ajusté, ils diminuent aussi rapidement suivant la chute drastique de viabilité pour *Frankia* sp. Avcl1 (figure 8B). Toutefois, avant cette concentration (40%), le pH des puits semble rester constant avec l'augmentation de la

concentration de DMA. Somme toute, les résultats du pH viennent appuyer ceux de la viabilité.

En ce qui concerne *Frankia alni* ACN14a en DMA à pH ajusté, le pH final reste stable (légère augmentation) même avec l'augmentation de DMA (figure 8D). Cette souche est reconnue pour fortement alcaliniser le milieu dans lequel elle croit, il n'est donc pas surprenant de voir des résultats plus bas avec le blanc. La stabilité des résultats obtenus avec le pH peut être expliquée par la survie qui semble être possible même avec de fortes concentrations en DMA. La mesure du pH des puits a montré que les souches étaient toutes aptes à alcaliniser leurs milieux. On retrouve en ordre croissant selon leur pouvoir de basification : *Frankia* sp. Avcl1, *Frankia* sp. ACN10a (dans le chapitre 3) et *Frankia alni* ACN14a. L'intégrité membranaire corroborait ces résultats (résultats non montrés) pour les deux souches. La toxicité élevée associée au pH peut d'une part être provoquée par l'augmentation de la disponibilité des différents métaux contenue dans le DMA. Par exemple, il est connu que le Cu, l'Ag et le Zn sont des métaux lourds ayant des propriétés antiseptiques et antimicrobiennes, et ce même à très faible concentration (action oligodynamique) (Tortora et al., 2003). Toutefois, il semblerait que ce soit la combinaison de la forte concentration en métaux et de l'effet associé au pH qui soit à l'origine de nos observations. En effet, la baisse du pH provoque une augmentation du degré d'ionisation des différents agents stressants (comme certains métaux) et de leurs capacités à pénétrer la cellule bactérienne (Black, 2008). En résumé, les souches *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. Avcl1 se sont montrées être assez sensibles au DMA, surtout à pH non ajusté. L'acidité a donc un effet direct sur celles-ci, ce qui l'empêche de proliférer normalement.

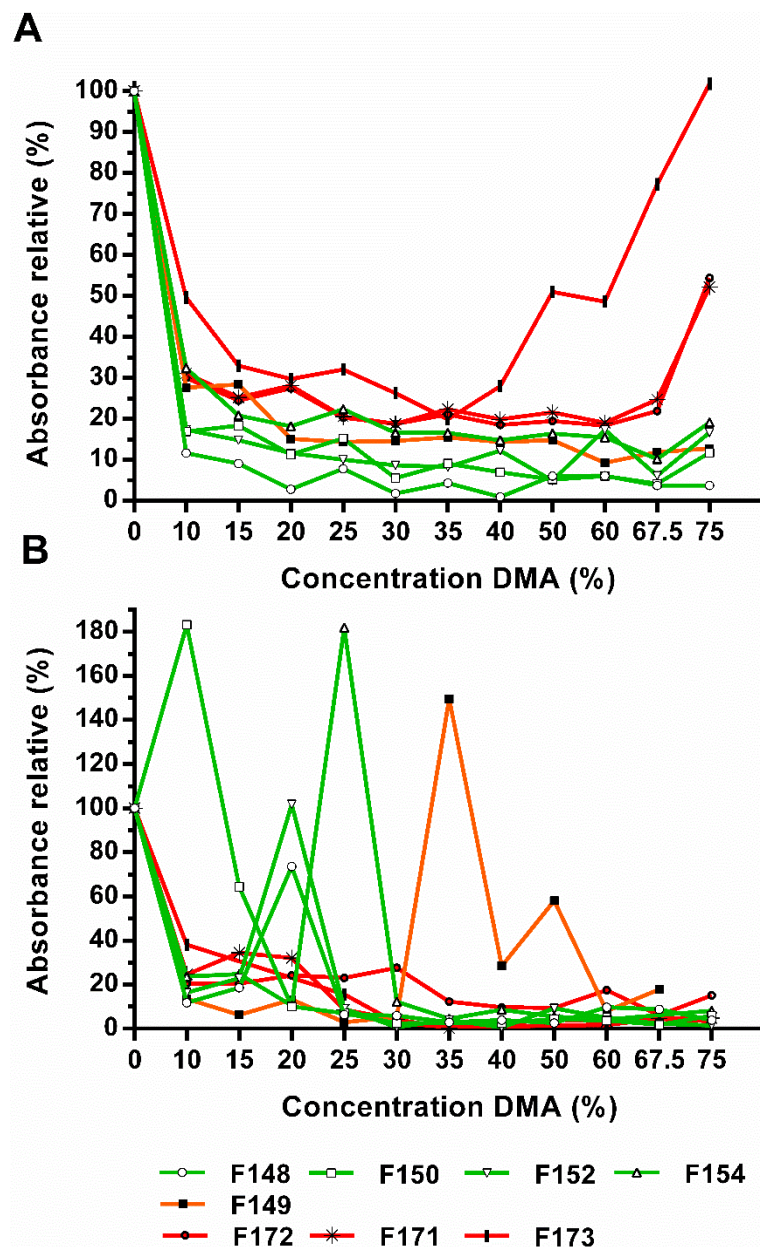


Figure 9. Résultats des tests de tolérance au DMA pour les souches de *Frankia* isolées sur le site minier de Doyon. Les souches F148, F150, F152 et F154 (courbes vertes) proviennent de zones non contaminées au DMA (la souche de *Frankia* Cpl1 est la plus apparentée). La souche F149 (courbe orange) provient

d'une zone partiellement contaminée (la souche de *Frankia* Cpl1 est la plus apparentée). Les souches F171, F172 et F173 (courbes rouges) proviennent de zones fortement contaminées au DMA (la souche *Frankia* ACN12a est la plus apparentée). Le premier graphique (A) représente les microplaques où le pH du DMA a été ajusté à 6.7 (A) et le deuxième (B) celles où il n'a pas été ajusté. L'absorbance relative représente la densité optique obtenue lors du test de réduction du MTS/PMS rapportée sur 100% (le 0% de DMA équivaut à 100%). Ce pourcentage représente la respiration cellulaire des souches.

En ce qui concerne la respiration obtenue pour les microplaques où le pH était ajusté à 6.7 (figure 9A), on observe que les souches isolées sur des zones non contaminées du site au DMA (F148, F150, F152 et F154) avaient des respirations relatives plus basses. Elles étaient donc plus sensibles au DMA. Pour les souches ayant été isolées sur des zones contaminées au DMA (F171, F172 et F173), on remarque qu'elles avaient tendance à se retrouver plus au haut du graphique. Elles sont donc plus tolérantes au DMA et verront leurs activités métaboliques moins touchées par l'augmentation du pourcentage en DMA. Pour la souche ayant été isolée sur une zone affectée par le DMA (F149), on remarque qu'elle se trouve à peu près à mi-chemin entre les deux autres catégories de souches. Aussi, il est intéressant de noter que les souches provenant de zones contaminées au DMA ont tous une hausse du métabolisme lorsque misent en contact avec de plus fortes concentrations de DMA à pH ajusté. En ce qui concerne les microplaques où le pH a été ajusté (figure 9A), les résultats obtenus pour le pH montraient une courbe assez stable pour les souches provenant de sites contaminés (pH 7 entre 0 et 75% de DMA). Les souches provenant de sites non contaminés montraient des résultats de pH allant de 7 (0%) à 8 (75%) (résultats non montrés). Donc, il devient facile de présumer que les souches retrouvées dans des milieux contaminés au DMA (plus acide) ont évolué de façon à ne pas prioriser l'alcalinisation du milieu. Combiné aux résultats MTS où l'on observait une

hausse de l'absorbance dans les plus fortes concentrations de DMA, il peut même sembler que les souches provenant de milieux contaminés croissent mieux en milieu acide. Aussi, semblerait-il que ces souches soient plus résistantes aux métaux contenus dans le DMA. Il existe quelques métaux toxiques, comme le chromate et l'arséniate, qui peuvent pénétrer à l'intérieur du cytoplasme par l'intermédiaire de systèmes de transports habituellement utilisés pour d'autres composés. En vue de maintenir l'homéostasie élémentaire, certaines bactéries résistantes pourraient sous-exprimer ou remplacer ceux-ci dans le but de limiter l'apport à l'intérieur de la cellule (Ramírez-Díaz et al., 2008). C'est peut-être le cas pour ces souches. Maintenant, pour les microplaques où le pH n'a pas été ajusté (figure 9B), on observe des résultats assez différents (figure 9B). Les souches ayant été isolées sur des aulnes se trouvant dans des zones non contaminées au DMA (F148, F150, F152 et F154) ont des hausses de respiration relative à différentes concentrations. Le pH final dans ces microplaques allait de 7 (0%) à 4.5 (75%) (résultats non montrés). Les pics de respiration observés ne surviennent qu'au-dessous de 30% en DMA à pH non ajusté, stade où le pH était entre 7 et 5.5 (résultat non montré). Pour la souche provenant d'une zone partiellement contaminée au DMA (F149), on observe aussi ce genre de pics, mais uniquement entre 30 et 60% de DMA où le pH était entre 5.5 et 4.75 (résultat non montré). Il semblerait que cette souche soit mieux adaptée à un pH plus bas et une plus forte concentration en métaux. Les souches provenant de zones contaminées au DMA (F171, F172 et F173) semblaient assez tolérantes à de faibles concentrations de DMA, mais leur activité métabolique tombait rapidement sous le seuil du 20% au-delà 30 à 35% en DMA. Globalement, il semble y avoir une certaine tolérance au DMA des souches provenant du site. Chez les procaryotes, l'homéostasie peut être maintenue de façon adéquate grâce à plusieurs mécanismes agissant communément (Summers, 2009). Des pompes permettant l'entrée de métaux en concentrations faibles dans le milieu extérieur, des pompes à efflux pour éliminer les surplus de métaux dans le cytoplasme et des protéines relais amenant les métaux des pompes vers leurs cibles cellulaires seraient trois exemples de ces possibles mécanismes. Enfin, il est aussi connu que les bactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia* sont aptes à faire appel aux

sidérophores pour l'acquisition de Fe (Aronson et Boyer, 1994; Boyer et al., 1999). Ceux-ci permettent aussi d'exclure d'autres métaux qui peuvent être toxiques (Kraepiel et al., 2009).

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet était unique en son genre, car pour une première fois il venait évaluer ce qui se passait quand de jeunes plants d'aulnes rugueux et d'aulne crispé étaient mis en contact avec du DMA après établissement de la symbiose actinorhizienne. Il se voulait être la continuité de deux autres projets ayant pour buts la caractérisation de la réponse symbiotique aux métaux lourds pris individuellement (Bélanger, 2010) et celle de la symbiose mise en contact avec des résidus fins (Barrette, 2017). Ce projet a permis de simuler de déversement de DMA afin de mieux comprendre comment les plantes (et les bactéries) pourraient réagir à un évènement ponctuel.

L'effondrement d'une digue ou une crue printanière sont deux exemples de déversement pouvant survenir. L'accumulation de métaux lourds dans les feuilles et la translocation de ceux-ci dans l'environnement sont des enjeux de taille lorsqu'on parle de mettre des plantes sur des sites contaminés aux métaux lourds. De plus, le projet visait à mieux comprendre un aspect des sites à fort potentiel acidogène, premier problème en importance de l'industrie minière canadienne. Il venait aussi offrir de l'information sur la colonisation naturelle sur un site orphelin, problème important sachant que le Québec en comporte 679 (Charbonneau, 2014). Le projet s'est aussi penché sur la possibilité d'utilisation de nouvelles souches de *Frankia* isolées à même le site minier. Il est primordial de bien comprendre la problématique du DMA et ses effets sur les différents organismes sans risque pour l'environnement. Deux articles ont

été rédigé dans le cadre de ce projet. Le premier article s'est voulu plus général et visait l'étude du développement et de l'homéostasie élémentaire chez l'aulne actinorhizé en l'absence de DMA. Cette étude a permis une meilleure compréhension des différents mécanismes de développement morphologiques de l'aulne rugueux (*Alnus incana* spp. *rugosa*) et de l'aulne crispé (*Alnus viridis* spp. *crispa*) ainsi que l'évolution de leur symbiose avec *Frankia* ACN10a dans le temps. Au niveau morphologique, on notait que l'aulne rugueux formait un plus grand indice de biomasse volumétrique, un plus grand nombre de nodules en des nodules plus gros que l'aulne crispé. Ces caractéristiques sont des facteurs déterminants dans le choix d'une espèce dans un cadre de régénéralisation. Par exemple, il peut parfois être nécessaire de prioriser une espèce développant plus de biomasse aérienne dans le but de diminuer l'érosion éolienne. L'aulne crispé avait quant à lui une plus forte allocation nodulaire et un plus grand ratio A/R (corrélée à l'efficacité de la symbiose). Encore une fois, une espèce pouvant développer un plus grand ratio et avoir une efficacité symbiotique plus élevée peut être à prioriser dans un environnement pauvre en nutriment. De plus, l'analyse des différents métaux contenus dans les différentes parties de l'aulne crispé s'est avérée riche en informations. Il a été démontré que le Mo était beaucoup plus présent dans les feuilles de plants non inoculés (corrobore Barrette (2017)). Le Mo étant essentiel à l'enzyme nitrogénase (Kraepiel et al., 2009), il se pourrait qu'une accumulation de Mo dans les tissus foliaires serve à améliorer la biodisponibilité de ce métal dans le sol et le rendre accessible aux fixateurs d'azote lors de la tombée des feuilles. Le Mo était aussi retrouvé en plus forte concentration dans les nodules des plants au stade précoce de développement. Il se pourrait que ce soit à ce moment que ce métal soit le plus essentiel, à cause d'un plus grand besoin de l'enzyme nitrogénase. Cette seconde observation au niveau des nodules était aussi observée pour le B, le P et le Cu. Pour le B, on pouvait s'y attendre, car le B est connu pour stimuler la fixation de l'azote et est également reconnu comme essentiel au développement des nodules (Kabata-Pendias, 2011). Dans les feuilles et les racines des plantes non inoculées, nous avons observé des niveaux plus élevés de B avec l'augmentation du temps. Ceci pourrait s'expliquer par le mécanisme passif d'acquisition du B qui produirait des

niveaux plus élevés de cet élément dans l'aulne non inoculé avec le passage du temps (plantules plus âgées). L'absence de symbiose chez les plantes non inoculées pourrait expliquer la distribution dans les tissus aériens par rapport à ce qui a été trouvé dans l'aulne nodulé. En ce qui concerne le P, il est connu pour être essentiel au développement racinaire (SIAAP, 2004), ce qui pourrait expliquer sa forte teneur en début de croissance. Dans cette même lancée, le Cu pourrait aussi être en plus forte concentration dans les jeunes stades de la plante à cause de son importance dans la composition de plusieurs enzymes et de quelques protéines (Rout et Das, 2003; Hall, 2002). Le chapitre quatre a montré que les aulnes inoculés semblaient bien se développer après exposition ponctuelle au DMA, et ce même si les plants étaient jeunes et avaient cru dans un sol inorganique. Le statut symbiotique change la concentration et la distribution élémentaire à l'intérieur de la plante et permet d'acquérir certains métaux comme le Co, et l'Al en plus fortes concentrations tout en restant en dessous du seuil de toxicité de la plante. L'analyse des métalloïdes et des métaux indiquait que la teneur des feuilles d'aulne crispé était en deçà des normes du critère C (sols industriels) pour : As, Cu, Pb, Zn, Cr, Cd, Ni, Ag, Ba, Mo, Co, Mn et Se. En comparant aux Normes BNQ pour les composts, il s'est avéré que ces feuilles d'aulne, une litière riche en azote, pourraient constituer un compost de qualité A et AA. Les nodules se sont avérés contenir plus de Pb, Co et de Ni que les feuilles. Il a été mis en évidence que l'homéostasie que l'on savait associer à la symbiose actinorhizienne était d'une part due à la rétention de certains métaux dans les nodules. Dans de futurs travaux, il serait intéressant de vérifier si cette filtration est bien causée par la présence de nodules et non par l'effet de la taille des plants. Pour ce faire, il serait possible de fournir une plus grande quantité d'azote exogène aux plants non inoculés afin de leur permettre d'atteindre une taille semblable à ceux étant inoculés. Aussi, la présence d'une symbiose bien établie semblait atténuer l'impact du DMA sur la plante. Les essais en microplaques ont montré différentes tolérances au DMA pour trois souches bien connues. On retrouve en ordre croissant de tolérance: *Frankia* sp. Avcl1, *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia alni* ACN14a. Il est à noter que *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia alni* ACN14a étaient à peu près équivalentes pour le DMA à pH non ajusté. Leurs aptitudes

à alcaliniser le milieu ont aussi été quantifiées et il s'est avéré qu'en ordre croissant de pouvoir d'alcalinisation on retrouvait *Frankia* sp. Avcl1, *Frankia* sp. ACN10a et *Frankia alni* ACN14a. L'étude de différentes souches isolées du site minier a démontrée que les souches retrouvées sur des parcelles de sites étant très contaminés au DMA étaient très résistantes aux métaux contenus dans le DMA lorsque le pH était ajusté à 6.7. Cette observation pourrait découler d'une résistance acquise au fil du temps. De plus, dans ce même milieu elles allaient alcaliniser moins que les souches retrouvées sur des parcelles moins contaminées. L'ensemble de l'ouvrage couvre donc une bonne partie de l'information pouvant être nécessaire à l'élaboration de méthode de revégétalisation de sites miniers à fort potentiel acidogène en utilisant l'aulne et *Frankia* symbiotiques.

Concrètement, le projet de recherche se divisait en deux grands objectifs. Le premier visait la détermination de la tolérance au DMA de trois souches de *Frankia*. *Frankia* sp. ACN10a, *Frankia* sp. Avcl1 et *Frankia alni* ACN14a. Pour ce faire, plusieurs essais en microplaques ont été menés afin de déterminer laquelle serait la plus apte à croître dans un milieu contaminé au DMA. L'hypothèse de cet objectif était que les trois souches étaient sensibles au DMA produit dans les résidus de la mine Doyon. Le second objectif visait toujours à connaître l'effet du DMA, mais cette fois-ci sur l'aulne crispé (*Alnus viridis* spp. *crispa*) et de l'aulne rugueux (*Alnus incana* spp. *rugosa*), avec et sans symbiose actinorhizienne. L'hypothèse associée à cet objectif était que l'aulne et la souche *Frankia* sp. ACN10a étaient plus tolérants au DMA lorsqu'ils étaient en symbiose et que le statut symbiotique changeait l'acquisition et la distribution des microéléments dans la plante. La présence de symbiose actinorhizienne avec *Frankia* sp. ACN10a pourrait atténuer l'impact environnemental associé à l'exposition ponctuelle de l'aulne crispé (*Alnus viridis* spp. *crispa*) et de l'aulne rugueux (*Alnus incana* spp. *rugosa*) au DMA. Pour tenter de mieux comprendre comment les souches de *Frankia* et les aulnes réagissaient au contact du DMA, il était important de connaître

sa composition en métaux. Cela a permis de faire des liens entre les résultats, par exemple une augmentation de la chlorophylle, et la présence de certains métaux, comme le Mg. De fil en aiguille, un sous objectif est venu s'ajouter au premier objectif et a permis d'obtenir certaines informations complémentaires au projet. Il consistait à évaluer la tolérance d'autres souches de *Frankia* spp. (8 souches), qui ont été isolées à même le site minier de Doyon. Trois d'entre elles ont été isolées de zones contaminées au DMA, quatre ont été isolées de zones non contaminées au DMA et une dernière a été isolée d'une zone partiellement contaminée. Ces essais de tolérance au DMA pourront peut-être permettre de nouveaux essais de culture en serre et ultimement, permettront peut-être d'apporter des solutions d'amélioration aux techniques de revégétalisation actuelles.

À la lueur des résultats obtenus au cours de ce projet, il serait intéressant d'analyser la teneur en métaux des différentes parties de la plante pour l'aulne rugueux, cette analyse n'ayant pas été possible au cours du projet de maîtrise. Cette analyse permettrait non seulement une meilleure connaissance de la distribution élémentaire à l'intérieur de la plante selon les différentes conditions, mais permettrait aussi de voir quelles sont les différences existantes avec l'aulne crispé. Aussi, après analyse des différentes souches de *Frankia* isolées sur le site de Doyon, il serait pertinent d'envisager des essais en serres ou sur le terrain. Pour évaluer comment les souches qui se sont montrées plus tolérantes au DMA se comporteraient en symbiose avec l'aulne sur des sites à forts potentiels acidogènes. Les connaissances générées dans ce projet pourraient s'avérer utiles si une minière voulait implanter un couvert végétal autour d'endroits à risque de déversement de DMA ou de crue printanière. De plus, il a été démontré que le risque de translocation des métaux dans l'environnement était faible pour les plants âgés de 25 semaines, l'implantation d'un couvert végétal aux alentours des sites miniers pourrait donc être envisageable. Un tel couvert végétal

nécessiterait peu ou pas d'entretien, un avantage économique à long terme. Il serait pertinent d'approfondir les études qui y sont associées.

BIBLIOGRAPHIE

- Adriano, D.C. (2001). Trace elements. In *Terrestrial Environments*, D. C., Adriano (New York: Springer New York).
- Alloway, B.J. (1995). Soil processes and the behaviour of heavy metals. In *Heavy Metals in Soils*, B.J., Alloway (Netherlands: Springer Netherlands), pp. 11–35.
- Aronson, D.B., and Boyer, G.L. (1994). Growth and siderophore formation in six iron-limited strains of *Frankia*. *Soil Biol. Biochem.* 26, 561–567.
- Baker, D., Newcomb, W., and Torrey, J.G. (1980). Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. Eu11 (Actinomycetales). *Can. J. Microbiol.* 26, 1072–1089.
- Barrette, K. (2017). Étude de la symbiose actinorhizienne chez l’aulne en présence de résidus miniers aurifères acidogènes. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- BBC news (2000a). Death of a river.
- BBC news (2000b). Hungary appeals for ecological help.
- Beaulieu, M. (2016). Guide d’intervention - protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés.
- Bélanger, P.-A. (2010). Étude de l’effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. et sa symbiose avec l’aulne noir (*Alnus glutinosa* (L.) gaertn). Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Bélanger, P.-A., Beaudin, J., and Roy, S. (2011). High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. *J. Microbiol. Methods* 85, 92–97.
- Benson, D.R., and Dawson, J.O. (2007). Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. *Physiol. Plant.* 130, 318–330.
- Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete

symbionts of actinorhizal plants. *Microb. Rev.* 57, 293–319.

Bernèche D'Amours, A., Ghinet, M.G., Beaudin, J., Brzezinski, R., and Roy, S. (2011). Sequence analysis of *rpoB* and *rpoD* gene fragments reveals the phylogenetic diversity of actinobacteria of genus *Frankia*. *Can. J. Microbiol.* 249, 244–249.

Bissonnette, C., Fahlman, B., Fahlman, B., Khasa, D.P., Greer, C.W., Headley, J. V., and Roy, S. (2014). Symbiosis with *Frankia* sp. benefits the establishment of *Alnus viridis* ssp. *crispa* and *Alnus incana* ssp. *rugosa* in tailings sand from the Canadian oil sands industry. *Ecol. Eng.* 68, 167–175.

Black, J.G. (2008). *Microbiology: Principles and Explorations* (New York: John Wiley & Sons).

Blowes, D.W., Jambor, J.L., and Alpers, C.N. (1994). *The Environmental Geochemistry of Sulfide Mine-Wastes* (Ont. Canada: Nepan).

Boyer, G.L., Kane, S.A., J.A., A., and Aronson, D.B. (1999). Siderophore formation in iron-limited cultures of *Frankia* sp. strain 52065 and *Frankia* sp. strain CeSI5. *Can. J. Bot.* 77, 1316–1320.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Briat, J.F., and Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. III.* 322, 43–54.

Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., and López, R. (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1131–1140.

Chaignon, V. (2001). Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille, Aix-Marseille.

Charbonneau, P. (2014). Analyse des pratiques de valorisation des rejets miniers.

Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Cheng, S. (2003). Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10, 256–264.

Colombano, S., Saada, A., Guerin, V., Bataillard, P., Bellenfant, G., Beranger, S., Hube, D., Blanc, C., Zornig, C., and Giradeau, I. (2010). Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices. *Géosciences Pour Une Terre Durable* 403.

Dawson, J.O. (2008). Ecology of actinorhizal plants. In *Nitrogen-Fixing Actinorhizal Symbiosis*, (Urbana-Champaign, IL, U.S.A.: Springer), pp. 199–234.

Dazy, M. (2008). Caractérisation de la colonisation spontanée par les plantes de sols pollués. Rôle des systèmes cellulaires de détoxification. Dazy, M. (2008). Caractérisation de la colonisation spontanée par les plantes de sols pollués. Rôle des systèmes cellulaires de dét. Thèse de doctorat, Université de Metz, Metz.

Deschênes, L. (2006). Développement d'une méthode d'évaluation de la mobilité et de la disponibilité des éléments traces métalliques d'un sol.

Diem, H., and Dommergues, Y. (1985). *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant Soil* 87, 17–29.

Dietz, K.J., Baier, M., and Kramer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, Dietz, K.J. Eds. Prasad, M.N.V. & Hagemayer (Berlin: Springer-Verlag), pp. 73–97.

Dube, J.S., and Galvez Cloutier, R. (2005). Applications of data on the mobility of heavy metals in contaminated soil to the definition of site-specific remediation criteria. *J. Environ. Eng. Sci.* 4, 399–411.

MDDELCC. (2005). Guide relatif à la construction sur un lieu d'élimination désaffecté (Article 65, L. Q. E.).

Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A. 93, 5624–5628.

Environnement et changement climatique Canada (2016a). Code de pratiques écologiques pour les mines de métaux.

Environnement et changement climatique Canada (2016b). Indicateurs canadiens de durabilité de l'environnement : Rejets de substances nocives dans l'environnement.

Ferguson, K.D., and Erickson, P.M. (1988). Pre-mine prediction of acid mine drainage. In *Environmental Management of Solid Waste: Dredged Material and Mine Tailings*, W. Salomons, and U. Förstner, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 24–43.

Foy, C.D., Chaney, R.L., and White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 11–66.

Gadd, G. (1992). Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 197–203.

Garbisu, C., and Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresour. Technol.* 77, 229–236.

Gérard, M. (2001). Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé.

Glick, B.R. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21, 383–393.

Gouvernement du Québec (2015). Le plan nord à l'horizon 2035: plan d'action 2015-2020.

Greer, C.W., Mehta, P., Labelle, S., Guibord, N., Beaudin, J., Quoreshi, A., Fung, M., Khasa, D., and Roy, S. (2005). Remediation and revegetation of tar sands composite tailings containing naphthenic acids and high salt using alder- *Frankia* symbionts. *Plant Soil* 272, 277–290.

Greger, M. (1999). Metal availability and bioconcentration in plants. In *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, M.N.V., Prasad and J., Hagemayer

eds. (Berlin: Springer) éditeur Prasad, M.N.V. & Hagemayer, pp. 1–27.

Guay, R. (1997). Diversité microbiologique dans la production de drainage minier acide à la halde sud de la mine Doyon (Québec), Faculté de Médecine de l'Université Laval. Québec.

Gupta, R.K., Dobritsa, S. V., Stiles, C.A., Essington, M.E., Liu, Z., Chen, C., Serpersu, E.H., and Mullin, B.C. (2002). Metallothioneins: a new class of plant metal-binding proteins. *J. Protein Chem.* 21, 529–536.

Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Peñarrubia, L., and Amasino, R.M. (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117, 1227–1234.

Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A., and Ecker, J.R. (1999). Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97, 383–393.

Hudson-Edwards, K.A., Schell, C., and Macklin, M.G. (1999). Mineralogy and geochemistry of alluvium contaminated by metal mining in the Rio Tinto area, southwest Spain. *Appl. Geochemistry* 14, 1015–1030.

Huss-Danell, K. (1997). Tansley Review No. 93 -actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytol.* 136, 375–405.

IAMGOLD (2016). IAMGOLD website.

Igual, J.M., and Dawson, J.O. (1999). Stimulatory effects of aluminum on in vitro growth of *Frankia*. *Can. J. Bot. Rev. Can. Bot.* 77, 1321–1326.

Institut de la Statistique du Québec (2014). Bulletin statistique régional Abitibi-Témiscamingue.

Jensen, P., Wilson, M.T., Aasa, R., and Malmström, B.G. (1984). Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochem. J.* 224, 829–837.

Kabata-Pendias, A. (2011). Trace elements in soils and plants (Pulawy, Poland: CRC).

Kabata-Pendias, A., and Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants

(Pulawy, Poland: CRC).

Karley, A.J., Leigh, R.A., and Sanders, D. (2000). Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci.* 5, 465–470.

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19.

Kraepiel, A.M.L., Bellenger, J.P., Wichard, T., and Morel, F.M.M. (2009). Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *BioMetals* 22, 573–581.

Kramer, P.A., Zabowski, D., Scherer, G., and Everett, R.L. (2000). Native plant restoration of copper mine tailings: I. substrate effect on growth and nutritional status in a greenhouse study. *J. Environ. Qual.* 29, 1762–1769.

L.R.Q. c. M-13.1 (2017). Loi sur les mines (Canada: Gouvernement du Québec).

Lapointe, F., and Fytas, K. (2005). Potentiel d'utilisation du bauxsol comme matériel réactif d'une barrière perméable pour contrôler le drainage minier acide. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec.

Lasat, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31, 109–120.

Laurette, J. (2011). Role de la spéciation de l'uranium sur sa bioaccumulation, son transport et sa toxicité dans les plantes. Application à la phytoremédiation. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement.

Lefranc, E., Quoreshi, A., Khasa, D., Fung, M., Whyte, L.G., Roy, S., and Greer, C.W. (2010). Field performance of alder- *Frankia* symbionts for the reclamation of oil sands sites. *Appl. Soil Ecol.* 46, 183–191.

Ma, L., Rao, X., Lu, P., Huang, S., Chen, X., Xu, Z., and Xie, J. (2015). Acid-tolerant plant species screened for rehabilitating acid mine drainage sites. *J. Soils Sediments* 15, 1104–1112.

Marschner, H. (1995a). Mineral Nutrition of Higher Plants 2nd Edition (Germany: Academic Press).

- Marschner, H. (1995b). Diagnosis of Deficiency and Toxicity of Nutrients. In Mineral Nutrition of Higher Plants: Second Edition, (Germany: Academic Press), pp. 461–479.
- McIntyre, T. (2003). Phytoremediation of heavy metals from soils. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 78, 97–123.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., and Cook, N. (2000). Soil testing for heavy metals. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31, 1661–1700.
- MDDEP (2012). Directive 019 Sur l'industrie Minière.
- Meharg, A.A. (1993). The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiol. Plant.* 88, 191–198.
- MEND (2001). Mend Manual Volume 1 - Summary 5.4.2a.
- Mendez, M.O., and Maier, R.M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - an emerging remediation technology. *Environ. Health Perspect.* 116, 278–283.
- MERN (2017). GESTIM.
- MERN (2015). Plan de restauration Projet Grand-Duc (Doyon).
- MERN et MDDELCC (2016). Guide de préparation du plan de réaménagement et de restauration des sites miniers au Québec.
- MERN (2013). Histoire de l'industrie minière.
- MERN (2014). Cartes minières.
- MERN (2016). Liste des sites miniers abandonnés en date du 31 mars 2016 (Québec).
- Nittayajarn, A., and Baker, D.D. (1989). Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass. *Plant Soil* 118, 199–204.
- Normand, P., and Lalonde, M. (1982). Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Can. J. Microbiol.* 28, 1133–1142.
- Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., and Evtushenk, L. (1996). Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1–9.

Normand, P., Benson, D.R., Berry, A.M., and Tisa, L.S. (2014). The Family Frankiaceae. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, eds. (Berlin Heidelberg: Springer), pp. 339–356.

Parsons, W.F.J., and Fitter, A.H. (1987). Changes in phosphorus and nitrogen availability on recessional moraines of the Athabasca Glacier, Alberta. *Can. J. Bot.* 65, 210–213.

Pawlowski, K., and Bisseling, T. (1996). Rhizobial and actinorhizal symbiosis: what are the shared features?. *Plant Cell* 8, 1899–1913.

Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., and Figueira, E.M. de Almeida, .P. (2006). Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: effects on protein expression. *Appl. Soil Ecol.* 33, 286–293.

Peret, B., Swarup, R., Jansen, L., Devos, G., Auguy, F., Collin, M., Santi, C., Hocher, V., Franche, C., Bogusz, D., et al. (2007). Auxin influx activity is associated with *Frankia* infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*. *Plant Physiol.* 144, 1852–1862.

Petit, S. (2006). Source et devenir du mercure dans les lacs de la région minière de Chibougamau. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal.

Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J. (1999). Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In *Heavy Metal Stress in Plants*, J. Hagemeyer, eds. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 99–116.

Campbell, N., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.J., (2009). *Biologie de Campbell*.

Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., and Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21, 321–332.

Remon, E. (2006). Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-

dépollution. Thèse de doctorat, Université Jean Monnet, Saint-Etienne.

Richardson, D.M., Allsopp, N., D'Antonio, C.M., Milton, S.J., and Rejmánek, M. (2000). Plant invasions-the role of mutualisms. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 75, 65–93.

Roy, S., Khasa, D.P., and Greer, C.W. (2007). Combining alders , *frankiae* , and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Can. J. Bot.* 85, 237–251.

Sanità di Toppi, L., and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105–130.

Scheifler, R., Schwartz, C., Echevarria, G., De Vaufléury, A., Badot, P.M., and Morel, J.L. (2003). “Nonavailable” soil cadmium is bioavailable to snails: evidence from isotopic dilution experiments. *Environ. Sci. Technol.* 37, 81–86.

Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (1990). *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants* (Mishawaka, IN, U.S.A: Press Academic).

Shield, A. (2014). Sites miniers, il faudrait 83 ans pour tout restaurer. In *Le Devoir*.

Shifrin, N.S., Beck, B.D., Gauthier, T.D., Chapnick, S.D., and Goodman, G. (1996). Chemistry, toxicology, and human health risk of cyanide compounds in soils at former manufactured gas plant sites. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 23, 106–116.

Singer, P.C., and Stumm, W. (1970). Acidic mine drainage: the rate-determining step. *Science* 167, 1121–1123.

Summers, A.O. (2009). Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 138–144.

Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. (2003). *Introduction à la microbiologie (ERPI)*.

Trajanovska, S., Britz, M.L., and Bhave, M. (1997). Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation* 8, 113–124.

Tran, T. Sen, and Ziadi, N. (2006). Mehlich 3-Extractable Elements. In *Soil Sampling*

and Methods of Analysis, Second Edition, M.R. Carter and E.G. Gregorich, eds. (Québec: Lewis), pp. 43–49.

Valdés-López, O., and Hernández, G. (2008). Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: What about legumes?. *J. Integr. Plant Biol.* *50*, 1213–1222.

Wall, L.G., Valverde, C., and Huss-Danell, K. (2003). Regulation of nodulation in the absence of N₂ is different in actinorhizal plants with different infection pathways. *J. Exp. Bot.* *54*, 1253–1258.

